

UNIVERSITÉ DU MAINE
U.F.R. Sciences et Techniques
ÉCOLE DOCTORALE 3MPL E.D. 500

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU MAINE

Spécialité : Chimie et Physico-Chimie des Polymères

par

Charles ESNAULT

sous la direction du Pr. Jean-François PILARD

Titre :

**Modification électrochimique de surface pour la mesure des
interactions ADN/Protéines
(HsRad51 - Transposase)**

Soutenue le 26 juin 2012

JURY

Mme. Chantal GONDRAN	Université de Grenoble	MCU HDR, Rapporteur
Mr. Hamid MORJANI	Université de Reims	MCU HDR, Rapporteur
Mr. Guy LOUARN	Université de Nantes	PR, Examinateur
Mme. Axelle RENODON-CORNIERE	Université de Nantes	CR CNRS, Examinatrice
Mr. Benoît CHENAIS	Université du Maine	PR, Co-Directeur
Mr. Jean-François PILARD	Université du Maine	PR, Directeur
Mme. Corinne AUGÉ-GOUILLOU	Université de Tours	PR, Invitée
Mme. Nathalie CASSE	Université du Maine	MCU HDR, Invitée
Mme. Sagrario PASCUAL	Université du Maine	MCU HDR, Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Laurent Fontaine et ancien directeur de l'UCO2M pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe MSP de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM UMR CNRS 6283)

Que serait une thèse sans son directeur de thèse, pour ça je remercie le Pr. Jean-François Pilard pour m'avoir soutenu et dirigé tout au long de ce travail, et ce depuis mon Master 1. Egalement pour tout les échanges que l'on a pu avoir que ce soit scientifique ou non.

Je tiens également à remercier le Pr. Benoît Chénais pour avoir co-dirigé ce travail en particulier pour toute la partie biologique, et des longues discussions que nous avons eues.

Pour avoir rapporté et apporté leurs commentaires à ce travail je remercie les Dr. Chantal Gondran et Hamid Morjani.

Ce travail a été réalisé lors d'un projet régional, pour cela je remercie la région Pays de la Loire pour avoir soutenu l'ensemble du projet et sa réalisation.

Qui dit projet, dit équipe, je remercie le Dr. Masayuki Takahushi et le Pr. Fabrice Fleury pour nous avoir apporté la protéine HsRad51 et également le Dr. Axelle Renodon-Cornière pour avoir passé de longues heures (voire semaine) avec moi à produire et à purifier la protéine HsRad51. A cette équipe s'ajoute le Dr. Nathalie Casse, je ne saurai suffisamment te remercier, je peux néanmoins te remercier de m'avoir fait connaître et comprendre la biologie moléculaire et ceux depuis mon stage de Master 1, de toutes les discussions que l'on a pu avoir, et pour tout plein d'autres choses, mais la liste est trop longue. J'ajoute également mes remerciements au Pr. Guy Louarn pour tout le temps passé à l'XPS, les discussions et l'aide que vous avez pu m'apporter. Même s'il ne faisait

pas partit du projet régional, je tiens à remercier le Dr. Nicolas Delorme pour m'avoir consacré autant de temps à l'AFM.

Après autant de temps passé entre le laboratoire de chimie et le laboratoire de biologie, j'ai pu croiser de nombreuses personnes que ce soit dans le bureau ou dans les couloirs, en ne voulant oublier personne, je tiens à toutes les remercier pour leurs apports scientifiques ou personnel.

Je tiens également à remercier ma famille pour leur soutien durant toutes ces années qui m'ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail.

Dernièrement, je tiens à remercier le Dr. Christian Bour et toute son équipe de la clinique SOS Main (Le Mans), sans qui je n'aurais pu terminer mon travail de thèse.

Liste des abréviations

ADN - Acide DésoxyriboNucléique

AFM - *Atomic Force Microcopy*, Microscopie à Force Atomique

Ar - Groupement Aryle

ADP - Adénosine DiPhosphate

ARN - Acide RiboNucléique

ATP - Adénosine TriPhosphate

CV - *Cyclic Voltametry*, Voltampérométrie Cyclique

ECS - Electrode au Calomel Saturé

ET - Eléments Transposables

HTH - Hélice-Tour-Hélice

ITR - *Inverted Terminal Repeat sequences*

MS - Motif Sonde

PCR - *Polymerization Chain Reaction*, amplification d'ADN

QCM - *Quartz Crystal Microbalance*, Microbalance à Cristal de Quartz

RH - Recombinaison Homologue

SAM - *Self-Assembled Monolayer*

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*, Dodécylsulfate de Sodium

SPR - *Surface Plasmon Resonance*, Résonance Plasmonique de Surface

XPS - *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Spectrométrie Photoélectronique X

Sommaire

Introduction	3
1 Les biocapteurs	7
1.1 Les analytes cibles et leurs motifs sondes	8
1.1.1 Les analytes cibles	9
1.1.2 Les motifs sondes	9
1.2 Les biorécepteurs	11
1.2.1 Enchevêtrement	11
1.2.2 Adsorption	14
1.2.3 "Cross-linking"	14
1.2.4 Liaison covalente - Affinité	15
1.3 Les transducteurs	21
1.3.1 Les électrodes	21
1.3.2 Optique et Résonance PLAsmonique de Surface (SPR) . . .	27
1.3.3 Microbalance à Cristal de Quartz - QCM	33
1.3.4 Microscopie à Force Atomique - AFM	39
1.4 Conclusion du Chapitre 1	44
2 Elaboration d'une surface spécifique à l'étude des interactions ADN / Protéines	49
2.1 Fonctionnalisation de Surface	51
2.1.1 Electropolymérisation	51
2.1.2 Les SAM	54
2.1.3 Modification de Surface par Electrogreffage - Electro-réduction des sels de diazoniums	57

2.2	Modification de surface <i>via</i> la réduction de sel de diazonium pour l'obtention de couche organique <i>para</i> -benzene chlorure de sulfonyle (Ar-SO ₂ Cl)	62
2.2.1	Modification d'une surface par la réduction du sel de diazonium généré <i>in situ</i> à partir de la fonction nitro du composé para-nitrobenzène chlorure de sulfonyle	65
2.2.2	Réduction du sel d'aryldiazonium générés <i>in situ</i> à partir du groupement amino de l'acide sulfanilique sur différents substrats conducteurs	72
2.2.3	Chlorination de Ar-SO ₃ H en Ar-SO ₂ Cl par PCl ₅ et démonstration par voltampérométrie cyclique	81
2.2.4	Caractérisation de la couche organique Ar-SO ₃ H / SO ₂ Cl par XPS et par AFM	86
2.3	Réactivité de la surface ; vers l'accroche d'ADN	94
2.3.1	Réactivité vis-à-vis d'un nucléophile électrochimique modèle	94
2.3.2	Réactivité vis-à-vis d'un brin d'ADN non modifié	96
2.4	Conclusion du Chapitre 2	98
3	Etude de la formation du complexe ADNsb/HsRad51 - Vers l'inhibition de HsRad51	101
3.1	La Recombinaison Homologue et HsRad51	104
3.1.1	La Recombinaison Homologue et la réparation des cassures double brin	104
3.1.2	HsRad51 - Etude de la formation du nucléo-filament protéique autours de l'ADNsb	107
3.2	Etude de la formation du complexe de HsRad51 avec l'ADN simple brin - QCM et AFM	115
3.2.1	Formation du complexe ADNsb/HsRad51 en absence de co-facteur	116
3.2.2	Formation du complexe ADNsb/HsRad51 en présence du co-facteur ADP	124
3.2.3	Mise en place d'un modèle cinétique de la formation du filament HsRad51/ADNsb	129
3.2.4	Formation du filament HsRad51/ADNsb en présence d'ATP	139
3.3	Etude de l'inhibition de la formation du complexe ADNsb/HsRad51	145

3.3.1	Introduction sur l'inhibition de HsRad51 par le peptide BRC4-28	145
3.3.2	Première étude cinétique de l'association de HsRad51 avec l'ADNsb en présence de BRC4-28 <i>via</i> la QCM	147
3.4	Conclusion du Chapitre 3	152
4	Extension du système d'étude vers la formation du complexe ADNdb / Transposase	155
4.1	Les Transposases de classe 2 et leurs transpositions - L'exemple de Mos1	157
4.1.1	Le mode de transposition de type couper-coller	158
4.1.2	Détails de la formation du complexe pré-synaptique MOS1 - ADNdb	161
4.2	Etude de la formation du complexe ADNdb / Transposase	167
4.2.1	Etude cinétique et mécanistique de l'étape de complexation de MOS1 avec ses ITR - Utilisation de la protéine MOS1 produite en système bactérien	167
4.2.2	Etude cinétique et mécanistique de l'étape de complexation de MOS1 avec ses ITR - Utilisation de la protéine MOS1 produite en système eucaryote	177
4.3	Conclusion du Chapitre 4	184
	Conclusion Générale	187
	Annexe 1 - Matériel et Méthodes	I
	Annexe 2 - Protocole de production et de purification de la protéine HsRad51	VII
	Annexe 3 - Equations cinétiques employées dans les chapitres 3 et 4	XVII
	Bibliographie	XXXVIII

Introduction

Cette thèse a été effectuée au sein de l'équipe MSP (Méthodologie et Synthèse des Polymères) de l'Institut des Molécules et Matériaux (UMR 6283 CNRS) du Mans à l'Université du Maine, dans le cadre d'un projet (MIAPS pour Mesure des Interactions ADN / Protéines sur Surface) région Pays de la Loire. Ce projet regroupe quatre équipes venant de l'Université du Maine et de l'Université de Nantes. Il a été piloté par le Pr. Jean-François Pilard (Université du Maine) et est axé autour des savoir-faire de l'équipe de Biochimie de l'U3B (Université de Nantes, UMR 6204 CNRS) sur HsRad51 (Production et purification de la protéine - connaissance des mécanismes) dirigée par le Dr. Masayuki Takahashi. La participation de MMS le Mans et de l'IMN de Nantes, a permis d'apporter une dimension biologique de façon locale (production d'ADN et par la suite l'introduction d'une autre protéine la transposase) et une partie physique par l'utilisation de techniques comme l'XPS et la mise en place des fibres-optiques.

Les interactions entre l'ADN et des protéines interviennent dans la plupart des grands procédés biologiques, incluant la recombinaison de l'ADN, sa réparation, la régulation du génome ou encore dans la maintenance des chromosomes. De nombreuses techniques, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, permettent d'élucider les mécanismes intervenants dans les interactions ADN / Protéines. Parmi ces différentes techniques, nous pouvons constater l'émergence de techniques bio-physique comme les biocapteurs permettant d'étudier ces interactions sur une surface. Ces techniques de part leur développement, permettent d'obtenir rapidement des informations cruciales dans les mécanismes biochimiques intervenant dans les interactions ADN / protéines, comme les constantes d'équilibres ou encore les vitesses de réaction. D'une façon générale, les biocapteurs ont connu un très grand essor depuis la première formulation réalisée par Clark et Lyons en 1962, tant au point de vue

de la littérature scientifique que d'un point de vue industriel. Les biocapteurs permettent en effet la détection d'analytes cibles dans des milieux pouvant être complexes. Il existe également des biocapteurs permettant le suivi en temps réel d'une réaction biologique (protéine / protéine, ADN / ADN, ADN / protéine). Dans ce cas, il est généralement nécessaire de coupler différentes techniques pour résoudre les mécanismes invoqués. Il a été remarqué que le point central du biocapteur pour ce genre d'étude se trouve être l'état de surface du biocapteur. Ainsi, pour pouvoir établir un biocapteur permettant l'analyse de l'interaction entre une protéine et l'ADN, il faut, au préalable, concevoir une surface permettant l'immobilisation spécifique de l'ADN. Une fois l'ADN immobilisé, on peut y appliquer une protéine, et en fonction de la technique utilisée, en ressortir le mécanisme, voire les constantes cinétiques impliquées dans la réaction.

Dans ce contexte, le projet initial du MIAPS se compose de quatre principaux axes. Le premier est la conception d'une modification de surface destinée à l'immobilisation de façon covalente de brins d'ADN. Le deuxième axe est l'utilisation de cette surface modifiée par des brins d'ADN pour l'étude des mécanismes d'interaction entre une protéine humaine spécifique, HsRad51, avec de l'ADN mono-brin par l'utilisation de la Microbalance à Cristal de Quartz. Suite à l'identification des mécanismes, le troisième axe porte sur l'étude de la réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur spécifique de HsRad51 développé par l'équipe de l'U3B. Enfin, le quatrième axe porte sur l'éventualité de miniaturiser le support et d'y appliquer la technique de modification de surface, pour tendre vers un criblage de l'identification de cible thérapeutique.

Ainsi, après avoir fait un état de la littérature scientifique des biocapteurs et de chaque partie qui le compose, nous orienterons notre travail vers une modification de surface (électrogreffage par réduction électrochimique de sels d'aryldiazonium) permettant, *via* une fonction d'ancrage, l'immobilisation de brin d'ADN (simple ou double). Cette approche de modification se fera par l'emploi de la voltampérométrie cyclique. Chaque étape permettant d'aboutir à la modification finale des surfaces sera étudiée par la voltampérométrie cyclique, la microbalance à cristal de quartz, l'XPS ou encore l'AFM. La modification de surface sera également employée pour différents types de supports conducteurs (Carbone, Or, Chrome). Tous ces supports seront utilisés pour les dif-

férentes techniques convoquées. Nous utiliserons alors les surfaces modifiées pour l'immobilisation de simples puis doubles brins d'ADN non modifiés. Le fait que l'ADN ne soit pas modifié nous permettra d'introduire directement de longues séquences d'ADN spécifiques à la protéine étudiée.

Après avoir obtenu une surface permettant l'immobilisation de l'ADN, nous l'emploierons pour la mesure en temps-réel de la formation de complexes protéiques avec l'ADN. Dans un premier temps, nous concentrerons nos travaux sur une protéine humaine : HsRad51. Cette protéine possède en effet un rôle central dans le mécanisme de la recombinaison homologue et de la réparation de l'ADN chez l'Homme. Mais de part son mécanisme, celle-ci peut également intervenir dans le maintien de cellules cancéreuses lors de l'application de traitements anti-cancéreux. De ce fait, nous ferons dans un premier temps une étude du mécanisme d'interaction entre HsRad51 et l'ADN simple brin sur notre système d'étude *via* la microbalance à cristal de quartz. Nous emploierons également l'AFM pour permettre la visualisation du complexe nucléo-protéique pour affiner ainsi l'étude du mécanisme en proposant un modèle cinétique réactionnel. Cette étude permettra par la suite d'en étendre le fonctionnement en présence d'un inhibiteur spécifique à HsRad51 et d'en vérifier le mode de fonctionnement, établi par l'équipe du Dr. Masayuki Takahashi de l'U3B.

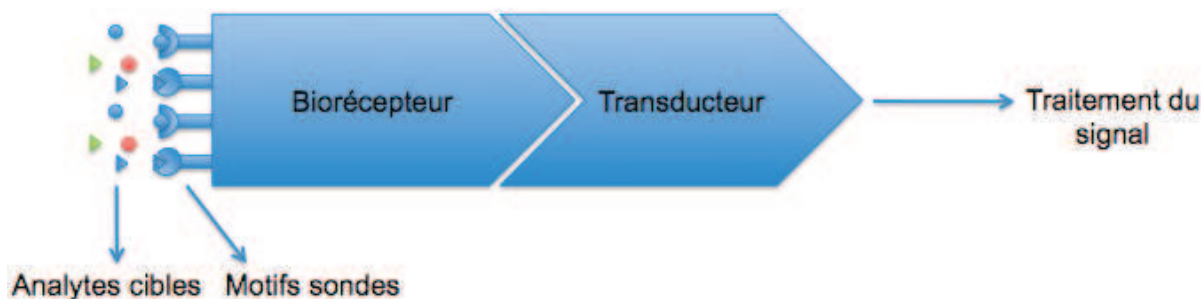
Cette première étude d'interaction entre une protéine et l'ADN simple brin, nous a amené à nous demander si nous pouvions étendre ce système d'étude à l'interaction entre un ADN double brin et une protéine spécifique à la séquence d'ADN introduite. Pour ce faire, nous avons employé une protéine intervenant également dans des processus de recombinaison de l'ADN. Cette protéine est une transposase de drosophile, la MOS1, servant actuellement de modèle biochimique dans le mécanisme de transposition de type couper-coller de l'ADN double brin. L'ADN support utilisé sera alors un ADN double brin auquel nous additionnerons la protéine. Celle-ci forme un complexe spécifique à une zone de la séquence d'ADN introduite. Nous nous efforcerons alors à partir du mécanisme réactionnel de ressortir les différentes constantes cinétiques, par QCM, impliquées dans la formation du complexe nucléo-protéique et d'en visualiser la forme par AFM.

Chapitre 1

Les biocapteurs

Avant-propos. Le terme biocapteur, traduction directe du terme "biosensor", dont le concept est introduit pour la première fois par Clark et Lyons en 1962 [1], décrit un système permettant l'analyse de molécules chimiques ou de molécules biologiques. Les biocapteurs peuvent être définis, même s'il en existe de plusieurs natures, selon un schéma général. Ce schéma général peut être décrit de la façon suivante (Figure 1.1) :

FIGURE 1.1 – **Schéma général de fonctionnement d'un biocapteur**



Les biocapteurs permettent de détecter la présence d'analytes cibles au sein d'une solution donnée. Ces cibles doivent être reconnues de façon spécifique, pour permettre la différenciation entre une molécule et les autres de la solution analysée. Pour cela, les cibles sont reconnues par des motifs sondes

spécifiques de l'analyte cible et fixés sur un biorécepteur. Le biorécepteur permet de capter l'interaction entre l'analyte cible et le biorécepteur *via* un signal de nature physique ou chimique. Les signaux physiques ou chimiques émis suite à l'interaction entre l'analyte cible et le motif sonde, sont transformés par le transducteur en un signal électrique pouvant être traité par un système d'exploitation (*via* une interface informatique). [2]

Ce concept permet alors d'envisager l'utilisation des biocapteurs de deux façons différentes : la première, et la plus commune dans la littérature, concerne la détection spécifique de molécules cibles (chimique ou biologique) dans une solution contenant une grande quantité d'autres molécules, et d'en connaître ainsi la quantité exacte. C'est ce que l'on pourrait nommer l'analyse par "biocapteur analytique". [2] La deuxième, moins répandue, et celle sur laquelle nous nous attarderons dans le cadre de ce travail, est l'étude, *via* l'utilisation de surface biocaptrice, de l'interaction même qui peut exister entre deux molécules biologiques, l'une étant fixée à la surface du biorécepteur et l'autre se trouvant en solution. Ce type de biocapteur pourrait être défini comme un biocapteur d'interaction.[3]

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous ferons un rappel bibliographique concernant les différentes parties qui constitue un biocapteur (analytes cibles et motifs sondes, biorécepteurs et transducteurs). Puis, nous orienterons notre étude vers un type particulier de biorécepteur et de transducteurs adaptés à l'étude de l'interaction entre l'ADN (motifs sondes) simple brin (sb) et/ou double brin (db) avec des protéines (analytes cibles). Le but sera de modéliser une surface bien définie permettant l'accroche de brins d'ADNsb/db.

1.1 Les analytes cibles et leurs motifs sondes

Comme il a été vu précédemment, le concept de biocapteur fut introduit par Clark et Lyons en 1962 [1]. Les auteurs ont ainsi démontré qu'il était possible de doser en solution le glucose par le biais d'une glucose oxydase adsorbée à la surface d'une électrode autorisant la mesure ampérométrique de l'oxygène. En effet, lors de la réaction d'interface, le glucose subit une réaction d'oxydation (analyte cible) par la glucose oxydase qui se retrouve dans un état réduit. La glucose oxydase est ensuite régénérée en formant à partir de l'eau du dioxygène

qui sera alors dosé par l'électrode à oxygène.

A l'aide de ce procédé et de part leur faible coût de production, une très grande quantité d'analytes cibles ont pu être détectées et analysées en faisant varier le motif sonde présent à la surface du biorécepteur.

1.1.1 Les analytes cibles

On retrouve dans la littérature une grande quantité d'analytes cibles, cela va de la simple molécule organique à la molécule biologique. On retrouve ainsi dans l'analyse des fluides biologique (sang, sérum, urine) la détection de molécules organiques, [4, 5] *via* des biocapteurs à base d'enzyme, comme le glucose, [6, 7] le cholestérol ou encore l'acide lactique. [8] L'adénosine triphosphate tient également une place importante dans l'analyse des molécules organiques (de part son intérêt dans l'activité biologique). [9] On retrouve également le dosage de beaucoup d'autres molécules organiques, principalement dans le cadre de contrôles alimentaire/ sanitaire/ dopage/ qualité de l'eau, comme les nitrates, [10] les phénols, [11] les métaux lourds (par la détection de leurs ions métalliques comme Hg^{2+}), [12] la dopamine, [13] etc...

Par ailleurs, on retrouve dans la littérature beaucoup d'études de dosage et de détection (/présence) de molécule biologique. L'un des grands axes est les biocapteurs, dits de puces à ADN ("DNA microarray"). [14] Ce dispositif permet en effet de détecter la présence ou non de séquence d'ADN spécifique. Du fait de la grande sensibilité de cette détection, celle-ci permet de détecter la présence d'une part de séquences propres à un organisme (bactérien par exemple dans les contrôles alimentaires) et d'autre part la présence de mutations au sein d'un génome (lors de l'étude de la présence de maladies dites génétiques).

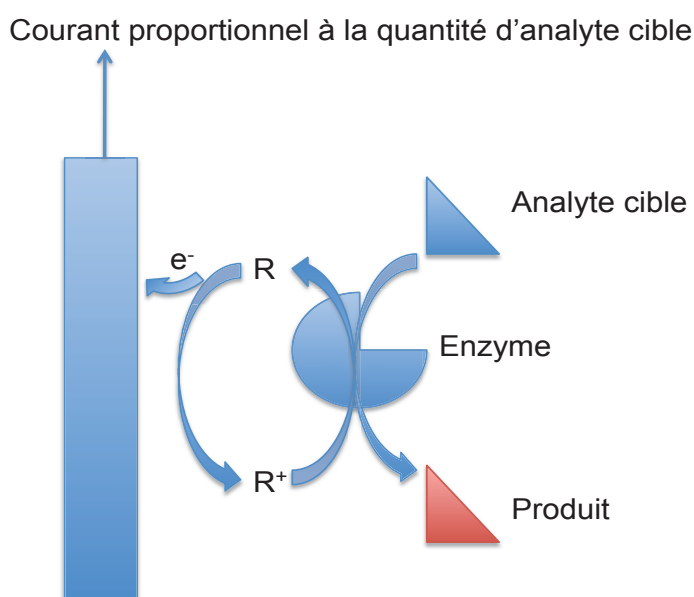
Parmi les molécules biologiques étudiées, on retrouve la détection de protéines. [15] L'étude de leur présence au sein d'un organisme vivant peut être déterminante pour détecter l'activité anormale de certains organes.

1.1.2 Les motifs sondes

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe une très grande quantité d'analytes cibles. Pour chaque analyte cible, il existe un motif sonde spécifique. Le motif sonde doit donc pouvoir interagir de façon discriminante

avec son analyte. Si l'on prend le cas général du glucose comme analyte cible, la glucose oxydase (GOD) correspond à un motif sonde. La glucose oxydase va permettre, selon une réaction d'oxydo-réduction, de transformer le glucose. L'un des produits de la réaction pourra alors être dosé par voie potentiométrique. Ce mécanisme d'interaction entre l'analyte cible et le motif sonde est à la base de tous les biocapteur dits d'enzymes, dont le mécanisme général est présenté dans le schéma suivant (Figure 1.2) :

FIGURE 1.2 – **Schéma général de fonctionnement d'un biocapteur à base d'enzyme**[16]



Ainsi, pour le glucose, on utilise comme motif sonde la glucose oxydase, pour le cholestérol on utilise la cholOD (cholestérol oxydase), pour l'acide lactique on utilise la lactate oxydase, pour les phénols on utilise la tyrosinase. La détection d'ions comme Hg^{2+} est basée sur la formation du complexe de coordination thymine- Hg^{2+} -thymine ($\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$). [12]

On retrouve également dans ce cadre, la détection de protéines, l'utilisation d'anti-corps spécifiques qui de part leurs formes particulières sont capables d'associer spécifiquement la protéine cible. [15]

Pour la détection de protéines, on retrouve aussi l'utilisation de petites séquences d'ADN nommées aptamères. Ces aptamères sont capables d'adopter des configurations particulières dans l'espace et ainsi de devenir spécifiques à une protéine donnée. [17] Ces aptamères peuvent être également adaptés à la détection de cellules, d'ADN complémentaires. Outre les aptamères, l'ADN peut être également détecté *via* des séquences d'ADN complémentaires. Pour ce faire un simple brin d'ADN est immobilisé sur la surface, l'ADN alors en solution doit se présenter sous forme simple brin pour pouvoir s'hybrider avec son brin complémentaire immobilisé. [18]

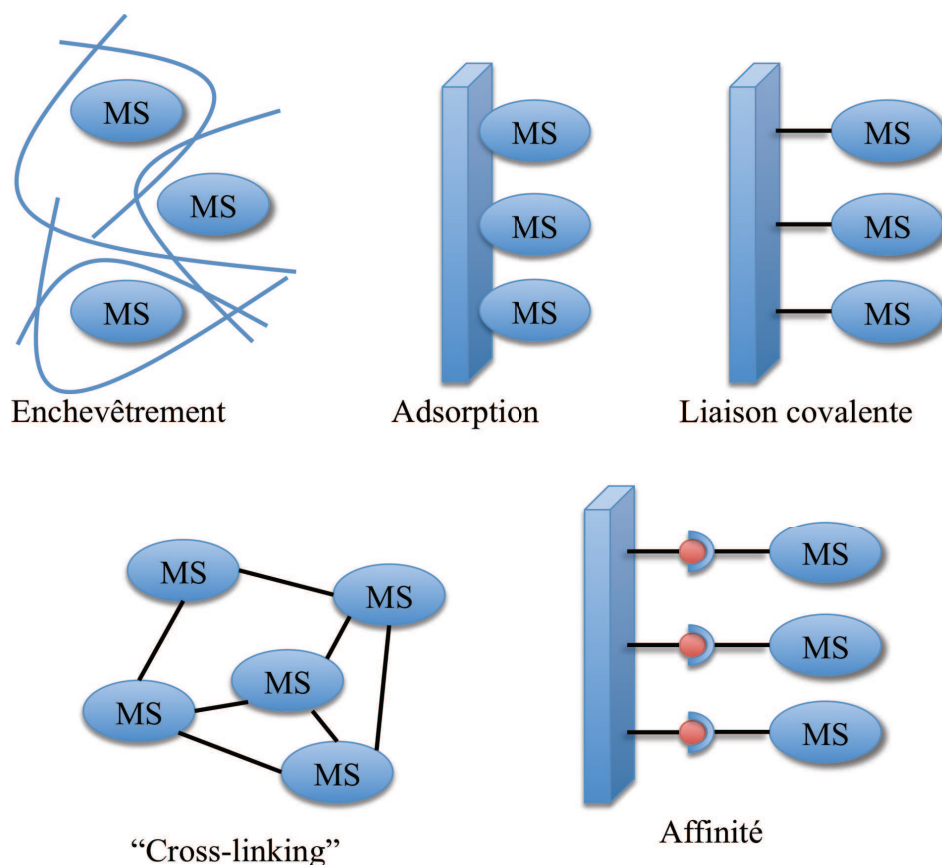
1.2 Les biorécepteurs

Le biorécepteur est un des maillons essentiels du biocapteur, car celui-ci doit en effet contenir le motif sonde. Pour ce faire, le motif sonde doit être maintenu à la surface du biocapteur sans altération de ses propriétés chimiques ou biologiques. Il doit également rester stable et actif dans le temps et de ce fait, ne pas être petit à petit éliminé de la surface. L'immobilisation du biorécepteur est donc un processus clef dans la viabilité d'un biocapteur. Ainsi, il existe un grand nombre de biorécepteurs basés sur différents types d'immobilisation du motif sonde. On retrouve dans la littérature cinq grandes familles d'immobilisation de motifs sonde : l'immobilisation par enchevêtrement, par adsorption, par "Cross-linking", par affinité ou bien encore par liaison covalente (cf. figure 1.3). [2] Nous nous attacherons à décrire les avantages et inconvénients de ces différentes approches.

1.2.1 Enchevêtrement

Cet exemple est plus particulièrement appliqué à l'immobilisation d'enzymes. Celles-ci sont immobilisées dans une matrice en trois dimensions. Ces matrices sont généralement constituées soit par des films polymères formés par électropolymérisation, soit de réseaux amphiphiles constitués de polydiméthylesiloxane (PDMS), de photopolymères, de gel de silice ou encore de polysaccharides. [2] La littérature décrit donc l'utilisation de cette méthodologie pour une large variété de motifs sondes et par conséquent l'analyse d'un grand nombre de molécules, telle que H_2O_2 [19], les nitrates [20], en passant par le glucose [21], l'ATP [22], les lactates [23], le cholestérol [24], ou encore certains

FIGURE 1.3 – **Schémas illustrant les différents types d'immobilisation de motifs sondes (MS) servant alors de biorécepteurs**

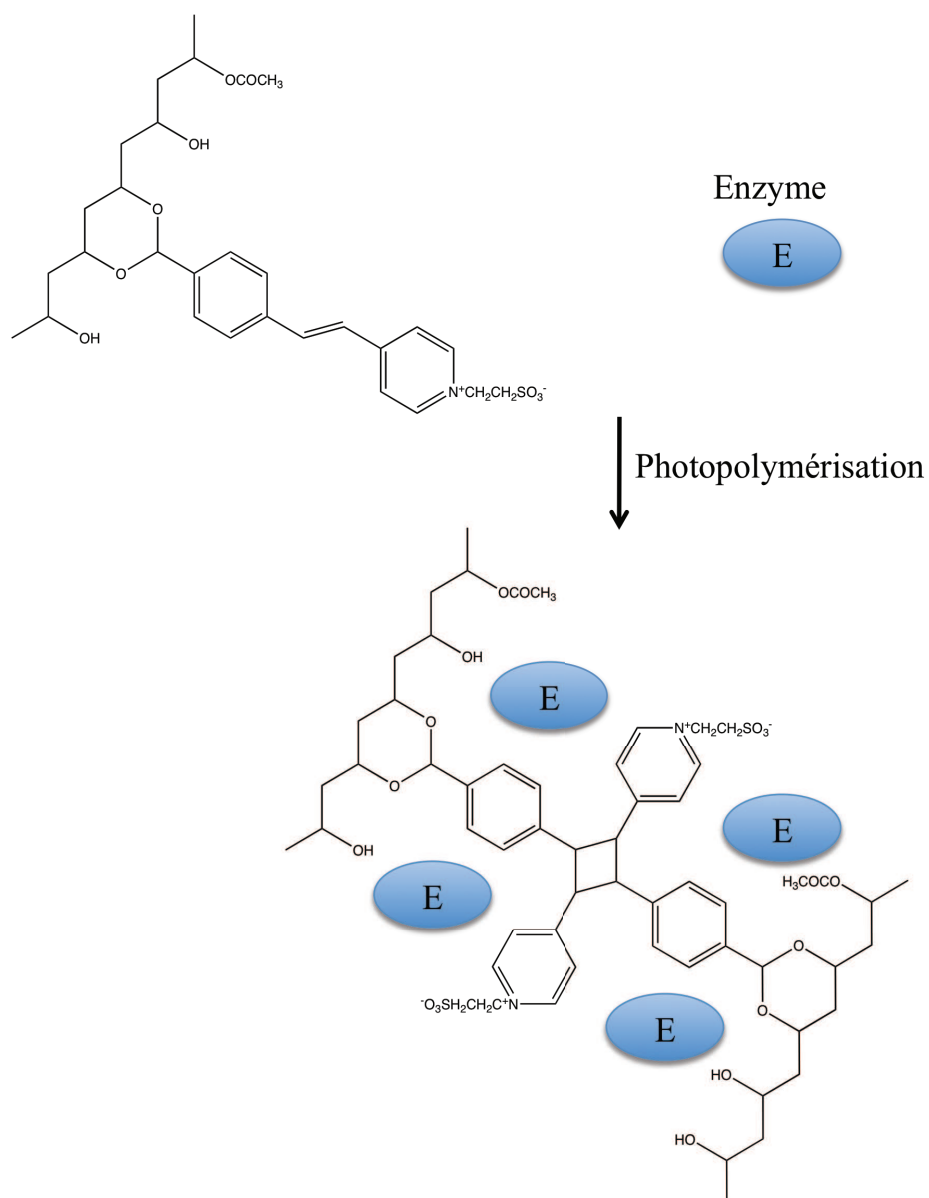


métaux lourds. [25] Les limites de détections vont jusqu'à 1.10^{-11} mol/L dans le cas de la détection des phénols. [11]

Pour ce type d'immobilisation, le motif sonde est déposé de façon simultanée au film. Par exemple, dans le cas de la photopolymérisation (cf. figure 1.4), l'enzyme est préalablement mélangée à la solution de monomère servant à la formation du film polymère. Cela ne nécessite pas de modifications au préalable des motifs sondes, ce qui permet de garder l'intégrité de l'activité du motif sonde. L'une des principales limitations de ce type de système réside dans l'éventuelle diffusion des motifs sondes en dehors de la matrice, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité du biocapteur. De plus, même si la littérature décrit quelques exemples d'enchevêtrement de sondes de type ADN, [26]

cette approche peut être limitante. Le manque d'accessibilité de l'ADN diminue en effet l'interaction entre le motif sonde et l'analyte cible (ADN ou protéine).

FIGURE 1.4 – **Exemple d'enchevêtrement d'une enzyme lors de l'obtention d'un film polymère par photopolymérisation [27]**



1.2.2 Adsorption

La méthode par adsorption est particulièrement adaptée pour des biorécepteurs enzymatiques. Elle représente la méthodologie d'immobilisation la plus usitée, car, la plus simple à mettre en place. En effet, dans la plupart des cas l'enzyme est diluée (en solution), puis la surface solide est mise en contact avec la solution pendant une période fixe. La surface est enfin rincée à l'aide d'une solution tampon pour nettoyer la surface des enzymes non adsorbées. Les mécanismes d'adsorption d'enzymes sont principalement dus à des interactions de type Van der Waals, électrostatiques ou encore hydrophobiques. Les principales enzymes adsorbées sur surface solide ont été la glucose oxydase (pour la détection du glucose), l'Uréase (pour la détection de l'urée), la lactate oxydase (pour la détection du lactose) et la HRP (horseradish peroxydase pour la détection de H_2O_2). Les limites de détection sont de l'ordre de 1.10^{-7} mol/L. [28]

Même si ce genre de méthodologie affecte peu l'activité de l'enzyme, elle présente certains désavantages. Le principal concerne la désorption des enzymes de la surface solide, qui peut être provoquée par un simple changement de pH, de température ou encore par un changement de la force ionique du liquide. Un autre désavantage de la technique réside dans la non spécificité de l'adsorption : il est possible en effet, après une première modification, que la surface adsorbe d'autres espèces non spécifiques lors de l'utilisation du biocapteur dans la solution contenant l'analyte cible. [2]

1.2.3 "Cross-linking"

L'immobilisation par "Cross-linking" consiste à former un gel par co-réticulation d'enzyme avec par exemple du glutaraldéhyde (ou encore de l'hexaméthylènediamine) en présence de BSA. On forme ainsi des liaisons covalentes entre les protéines. Le gel peut être alors déposé sur une surface comme une électrode de travail pour l'obtention de biocapteurs de type conductimétrique. Ce type d'immobilisation a ainsi pu être reporté pour la détection de différentes molécules comme les métaux lourds [30], les nitrites [31], ou bien encore certains polluants organiques. [32] Il a également pu être combiné l'immobilisation mixte par "Cross-linking" et l'enchevêtrement qui, par addition de poudre de carbone, a permis de développer des biocapteurs enzymatiques. [33]

Ces biocapteurs ont la particularité d'être mis en oeuvre facilement et de posséder une bonne stabilité dans le temps. A titre d'exemple, il a été facilement démontré qu'un biocapteur développé pour la détection d'ions de métaux lourds par "Cross-linking" d'une phosphatase alcaline avec de la BSA dans du glutaraldéhyde sur une électrode, conservait son activité pendant un mois en solution à 4°C. [30]

Le principal inconvénient de ce type d'immobilisation réside dans la méthode même de formation du gel. En effet, les liaisons chimiques formées au cours de la réaction tendent à modifier la géométrie de l'enzyme et conduisent à une perte d'activité, donc une perte d'efficacité du biocapteur. Ces liaisons provoquent par ailleurs des changements conformationnels au sein de la structure de l'enzyme. De plus, des modifications chimiques des sites actifs peuvent également être affectées durant la formation du "Cross-linking".

1.2.4 Liaison covalente - Affinité

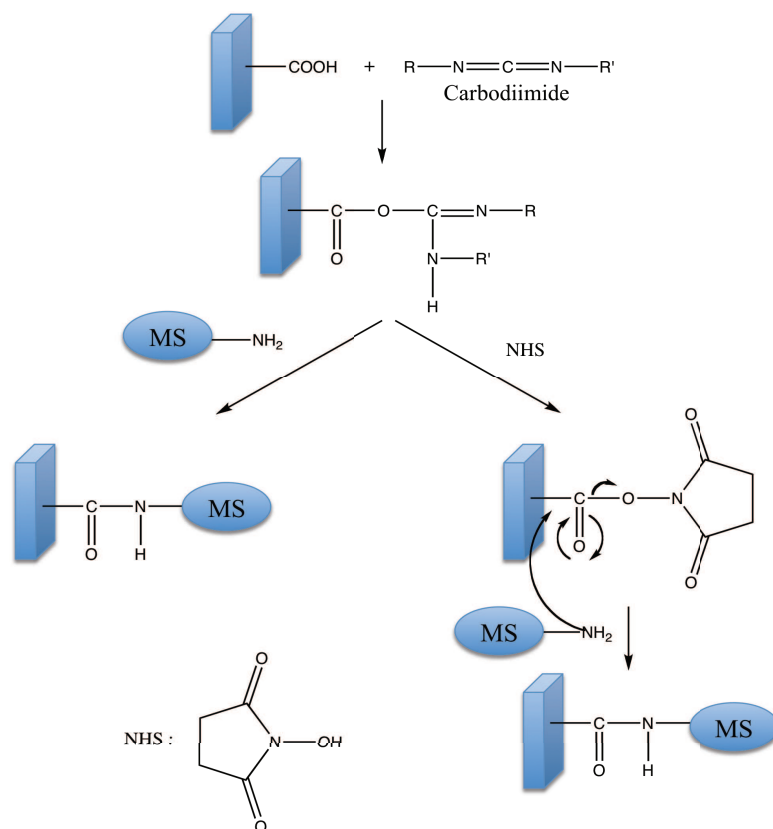
Les méthodes d'immobilisations par liaisons covalentes ou par affinités se fondent quant à elles sur une pré-modification de la surface autorisant par la suite l'accroche du motif sonde. Les méthodes de modifications de surfaces seront principalement traitées dans le chapitre 2, nous nous attacherons dans la présente section seulement aux motifs permettant l'immobilisation de motifs sondes (enzymes, ADN). Le principe de ces méthodologies d'immobilisations consiste à modifier une surface en lui intégrant des groupements fonctionnels qui réagiront ensuite de manière spécifique avec le motif sonde (par liaison covalente ou par affinité).

Liaison covalente

Dans le cas de l'immobilisation par liaison covalente, les motifs sondes, que ce soit une enzyme ou de l'ADN, sont généralement modifiés au préalable pour que ceux-ci puissent réagir avec la fonction d'ancrage. Les principaux types de groupements sont $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$, $-SH$, $-PO_4$ (dans le cas de l'ADN), ou encore plus récemment $-N_3$. [34, 35, 2] Ainsi, pour chaque fonction, on retrouvera un site d'ancrage spécifique sur la surface modifiée.

Ainsi, pour les différents groupements, la surface modifiée comprendra une fonction avec des propriétés nucléofuges. La réaction se fait alors

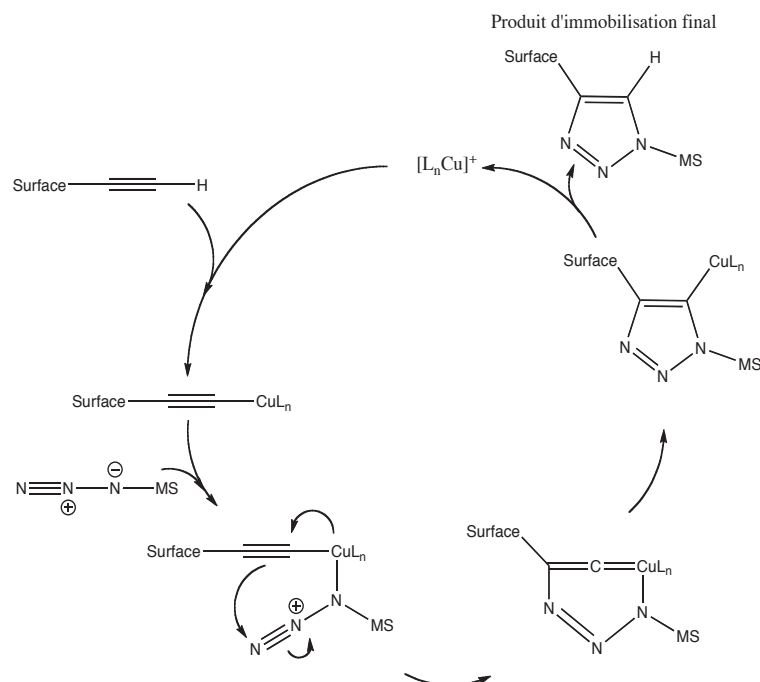
FIGURE 1.5 – **Différence entre une immobilisation par substitution nucléophile directe ou indirecte de motifs sondes modifiés par une fonction amine primaire en extrémité [2]**



par substitution nucléophile de la fonction se trouvant sur la surface modifiée permettant alors d'immobiliser le motif sonde. On retrouve deux types de réactions : la substitution directe ou indirecte du groupement se trouvant sur la surface modifiée. Dans le cas de la substitution indirecte, on active la surface en la faisant réagir avec une molécule organique ayant un fort pouvoir nucléofuge permettant alors d'augmenter l'efficacité d'immobilisation. La molécule la plus utilisée pour ce genre de réaction est la N-hydroxysuccinimide (NHS). Dans la figure 1.5, on retrouve une surface possédant des fonctions acide carboxylique que l'on fait réagir dans un premier temps avec un carbodiimide auquel on additionne (ou non) la NHS avant de faire réagir le motif sonde modifié en extrémité par une amine primaire. On peut également re-

trouver le couplage par NHS dans le sens inverse, avec modification préalable du motif sonde avec son extrémité NHS, et ainsi obtenir l'immobilisation de celui-ci sur une surface modifiée par une amine. On retrouve également l'immobilisation de motifs sondes modifiés en extrémité par un nucléophile par ouverture d'un cycle epoxyde ou par réaction d'addition-élimination sur un groupement maléimide.

FIGURE 1.6 – **Exemple d'un cycle catalytique permettant l'immobilisation d'un motif sonde (MS) sur une surface modifiée par une fonction alkyne lors d'une réaction de "Click chemistry" catalysée par un complexe de cuivre Cu(I)**



Dans le cas où le motif sonde est modifié en extrémité par un groupement azoture, il en résulte principalement trois types de fonctions (réactions) permettant l'immobilisation. On retrouve comme fonctions d'ancrages les phosphines *via* la réaction de Staudinger, les alkynes *via* la réaction de "click chemistry" catalysée par un complexe de Cu(I) (illustrée dans la figure 1.6), ou encore les amines par couplage.

Le principal avantage de l'immobilisation par liaison covalente est la spécificité de la liaison entre le motif sonde et la fonction d'ancrage. De plus, il est généralement possible de sélectionner l'emplacement du groupement modifiant le motif sonde. Il est ainsi possible de vérifier en amont que cette modification n'interfère pas avec l'activité du motif sonde (en particulier dans le cas des enzymes). Dernièrement, la liaison covalente permet d'immobiliser de façon "définitive" le motif sonde au biorécepteur.

Compte tenu des objectifs de notre travail, nous pouvons noter en dernier, l'immobilisation directe de brins d'ADN possédant une fonction SH à une extrémité de brin. Cette immobilisation, SAM (pour Self-Assembled Monolayer) s'opère principalement sur des surfaces d'or du fait de l'interaction physique entre l'or et le soufre. Elle permet alors de facilement immobiliser une séquence d'ADN. Elle oblige seulement au préalable la modification de la séquence d'ADN en son extrémité par une fonction SH. [29] Même si cette approche permet la formation de mono-couche bien définie, celle-ci nécessite néanmoins la modification préalable du brin d'ADN (par une fonction SH), ce qui limite la variabilité des séquences et oblige à travailler avec de courtes séquences d'ADN. D'un point de vue général la modification d'extrémité d'ADN reste limitant, car, la séquence doit être synthétisée à la suite de la modification. Le coût est alors directement proportionnel aux nombres d'acides nucléiques.

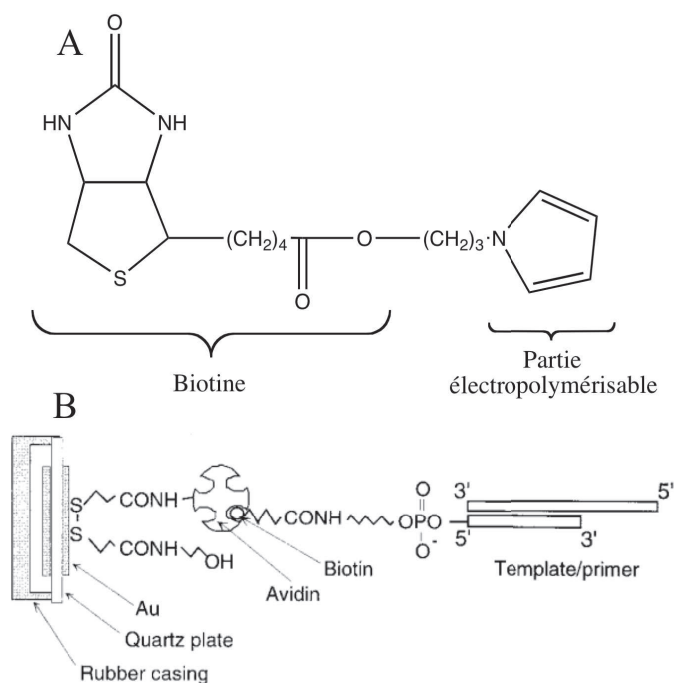
Affinité

L'immobilisation de motifs sondes par affinité est principalement fondée sur la formation de complexes à partir de liaisons faibles. La principale condition est l'existence d'un équilibre entre la forme complexée et la forme libre, où la constante de dissociation du complexe est très faible. Dans ce cas, on retrouve principalement la formation du complexe biotine-(strept)avidine, la formation de complexe avec des ions métalliques (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , etc...) ou encore l'hybridation de l'ADN.

L'immobilisation de motifs sondes par affinité, concerne principalement l'affinité biologique, l'exemple le plus courant est le couplage biotine-(strept)avidine. L'emploi de cette immobilisation par affinité vient de l'existence d'une forte affinité entre la protéine avidine et la molécule biotine (constante de dissociation de l'ordre de 10^{-15} M). Généralement, la biotine est fixée à la surface selon

les différentes procédures que l'on a déjà pu évoquer. Elle peut également être directement liée de manière covalente à un monomère qui sera par la suite polymérisé par voie électrochimique. Le film polymère ainsi formé à la surface de l'électrode de travail possède directement la fonction biotinique (cf. figure 1.7-A). [36, 37] L'avidine qui est intégrée à l'enzyme vient alors s'associer avec la molécule de biotine présente à la surface du biorécepteur. On retrouve également dans le cas de l'immobilisation de brin d'ADN, la formation de complexe biotine-(strept)avidine, où la fonction biotinique se trouve en extrémité du brin d'ADN et dans ce cas, l'avidine est préalablement fixée à la surface (cf. figure 1.7-B). [38]

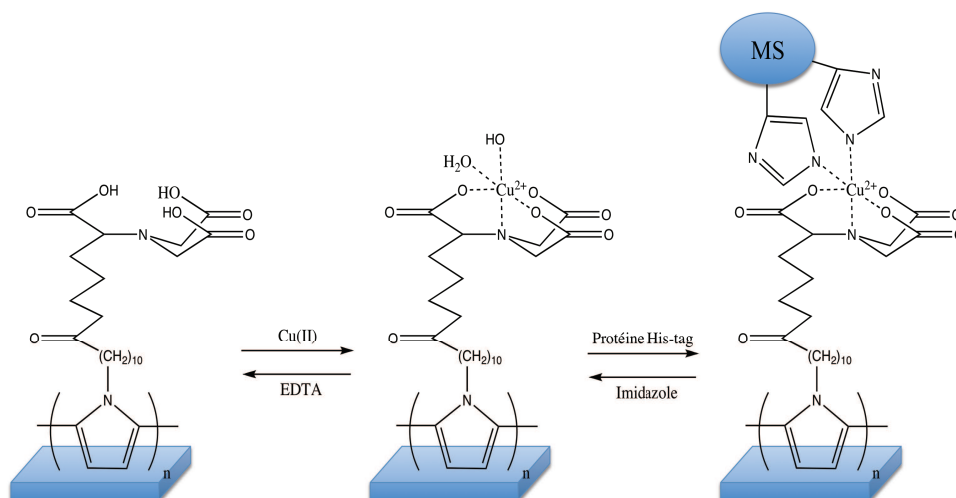
FIGURE 1.7 – A : Exemple d'un monomère engagé dans l'électropolymérisation d'un poly(pyrrole-biotine) comprenant une partie électropolymérisable et la biotine servant à immobiliser par affinité l'avidine d'après les travaux de Cosnier et al. [37]; B : Exemple d'une immobilisation par affinité biotine-avidine d'une séquence d'ADN sur un cristal de quartz d'or d'après les travaux de Niikura et al. [38]



Dans le cas de l'affinité par des complexes métalliques, l'immobilisation de

protéine est surtout utilisée en chromatographie pour retenir les protéines d'intérêt, capables de se fixer à la colonne. Pour ce faire, les protéines exprimées sont produites avec un tag en extrémité de type histidine par exemple (généralement six histidines sont alignées en extrémité de la protéine). Ce tag histidine se complexe alors à la colonne de chromatographie possédant des complexes métalliques de type nickel ou cuivre. Une fois les protéines séparées des autres protéines produites lors de l'expression en cellule, il est généralement effectué un lavage pour décomplexer la protéine de la colonne et ainsi récupérer uniquement la protéine d'intérêt. [2] Les principales méthodes de lavage se font soit en réduisant le pH, ou en changeant la force ionique ou encore par l'utilisation d'agent chimique tel que l'EDTA ou l'imidazole. Ce type d'immobilisation a également été développé sur des surfaces modifiées pour la détection de lactate [39] ou encore de glucose [40] en fixant l'enzyme d'intérêt *via* un tag histidine positionné en extrémité de celle-ci (cf. figure 1.8). [41]

FIGURE 1.8 – **Exemple d'une immobilisation par affinité lors de la complexation d'un motif sonde modifié par un tag de type histidine à un complexe de cuivre Cu(II) lui même chélaté sur un film de poly(pyrrole)-NTA (NTA pour acide nitrilotriacétique) d'après les travaux de Haddour et al. [40]**



On peut également noter dans la catégorie des interactions par affinité, la réaction d'hybridation entre deux ADN simple brin complémentaires. Ce genre

d'interaction permet à partir d'un ADNsb pré-immobilisé de façon covalente à la surface, d'ajouter une séquence complémentaire qui peut être de plus grande taille ou posséder d'autres fonctions en extrémité permettant alors la détection d'autres analytes cibles, voire tout simplement d'autres séquences d'ADN.

1.3 Les transducteurs

Les transducteurs constituent la dernière partie du biocapteur avant le système d'exploitation. Celui-ci sera déterminant puisqu'il permet la mesure d'un signal directement proportionnel à la réaction qui a lieu à l'interface entre le dispositif et le milieu biologique. Le premier transducteur à avoir été utilisé dans les travaux de Clark et Lyons [1], est une électrode de platine pour mesurer un signal électrique issu de la réaction qui a eu lieu à la surface. Nous retrouvons donc comme transducteur, et par conséquent comme techniques de détections, toutes les techniques électrochimiques par l'électrode de travail, les techniques optiques, la microbalance à cristal de quartz (QCM) et la microscopie à force atomique (AFM).

1.3.1 Les électrodes

Comme nous avons pu le voir, le premier type de transducteur à avoir été utilisé, a consisté en une électrode sur laquelle est adsorbée une glucose oxydase. Les électrodes permettent en effet de mesurer un courant électrique issu d'un échange d'électrons entre la surface de l'électrode et la solution. L'utilisation de l'électrochimie en solution connaissant toujours de forts développements (techniques ou théorique [42]), nous nous arrêterons principalement sur quelques techniques très généralisées comme la potentiométrie, la voltampérométrie cyclique ou encore l'impédance électrochimique à travers des réactions d'oxydo-réduction ou bien de transfert électronique.

En effet lors d'une réaction d'oxydo-réduction, on fait intervenir une quantité n_{e^-} d'électrons selon le schéma réactionnel suivant :



Où Ox représente l'espèce oxydée et Red représente l'espèce réduite. Lorsque

cette réaction a lieu à la surface d'une électrode, le potentiel de cette électrode à l'équilibre obéit à la loi de Nernst, qui d'une manière générale peut s'écrire :

$$E_{eq} = E^0 + \left(\frac{RT}{n_e F}\right) \ln\left(\frac{a_{Ox}}{a_{Red}}\right) \quad (1.2)$$

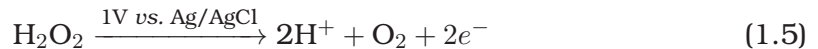
Ainsi, en modifiant la valeur du potentiel, on déplace l'équilibre de la réaction Redox Ceci se traduit par le passage d'un courant électrique à travers le circuit électrique. Si on applique un potentiel $E > E_{eq}$, l'équilibre est déplacé dans le sens d'une oxydation et le courant obtenu est un courant anodique (considéré par convention comme positif). En revanche, si l'on applique un potentiel $E < E_{eq}$, l'équilibre est déplacé dans le sens d'une réduction et le courant obtenu est un courant cathodique (considéré par convention comme négatif).

Ces phénomènes Redox sont ainsi à l'origine du passage d'un courant dit Faradique correspondant au cas où une réaction électrochimique a lieu à la surface de l'électrode. Ce courant résulte d'un processus obéissant à la loi de Faraday :

$$Q = \frac{n_e F m}{M} \quad (1.3)$$

Où Q (en Coulomb : C) est la quantité de charge électrique nécessaire à la réaction, m (en g) la masse du produit organique, M (en g/mol) sa masse molaire, n_e le nombre de moles d'électrons et F la constante de Faraday ($F = 96480C$, quantité d'électricité transportée par mole d'électrons).

A titre d'exemple, lorsque l'on fixe sur une surface une glucose oxydase (GOD) pour la détection du glucose en solution (biocapteur à base d'enzyme de type oxydo réductase, cf. Figure 1.2), on peut résumer la suite réactionnelle selon le schéma suivant [2] :



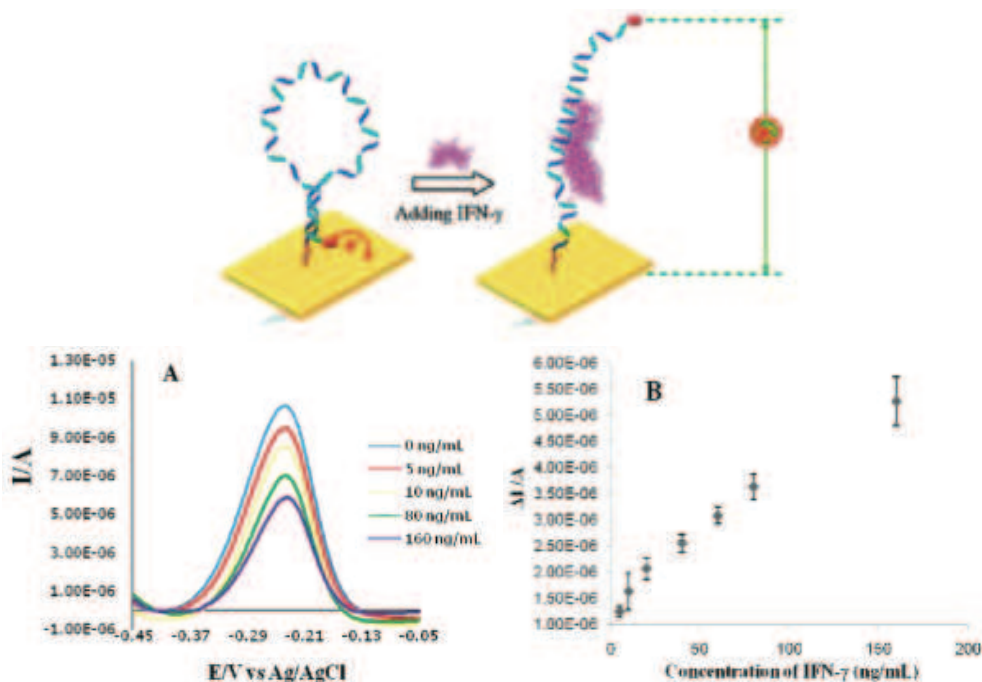
Dans l'équation 1.4, la transformation du glucose par la GOD fait intervenir le dioxygène, les produits de cette réaction sont l'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène. Ensuite, en appliquant un potentiel de 1 V par rapport à Ag|AgCl (sur électrode de carbone), on régénère le dioxygène selon l'équation 1.5 (mé-

canisme à deux électrons et deux protons). Les deux électrons de l'équation 1.5 génèrent un courant électrique mesurable. La quantité de courant mesuré est ainsi proportionnelle à la quantité de glucose introduit en solution selon l'équation 1.3. En remarque, on peut noter que le mécanisme fait également intervenir deux protons. La présence de protons dans le mécanisme implique que le potentiel à appliquer sera dépendant du pH de la solution.

La quantité de courant mesuré par l'électrode est également dépendante de la distance entre l'espèce et la surface. Ainsi, on retrouve des études fondées sur la résistance du transfert électronique liée à la distance entre une sonde redox et la surface. Généralement, la sonde redox (ferrocène) est fixée à l'extrémité d'un brin d'ADN (ou aptamère). Lorsque l'ADN se trouve sous une forme compacte, la sonde redox se retrouve proche de la surface, on mesure alors un courant Faradique venant de la réaction d'oxydation ou de réduction de la sonde. Dans le cas où l'ADN se trouve sous une forme étendue, la distance entre la sonde et la surface augmente, ce qui implique une augmentation de la résistance du transfert électronique entre la surface et la sonde. Cette augmentation de la résistance engendre directement une diminution du courant enregistré. Des études ont également été menées sur l'impact du mouvement de l'ADN sur l'allure et l'intensité des voltampérogrammes cycliques. [43, 44, 45]

On peut à ce propos noter les travaux de Liu *et al.* représentés dans la figure 1.9 où un aptamère modifié en extrémité par une sonde redox est fixé à la surface d'une électrode. [46] Cet aptamère adopte d'une part, une forme repliée lorsqu'il est seul en solution. D'autre part, il a la particularité de se complexer à la protéine IFN- γ pour donner une forme étendue. Ainsi, lorsque l'aptamère est replié sur lui même, la sonde redox se trouve proche de la surface, on peut alors mesurer un courant Faradique. La quantité de transfert électronique (de courant) va être directement proportionnelle à la quantité de sondes redox présente à la surface, mais également à l'éloignement de la sonde vis-à-vis de la surface. Ainsi, lorsque la protéine IFN- γ est additionnée à la surface de l'électrode. Lorsque celle-ci s'associe avec l'aptamère, celui-ci se déploie et éloigne la sonde redox de la surface. Cet éloignement augmente la résistance du transfert électronique et provoque une baisse de courant de pic. Dans la figure 1.9, est reporté d'une part le courant mesuré en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail pour différentes valeurs de la concentration

FIGURE 1.9 – **Schéma décrivant le transfert électronique entre la surface et une sonde redox fixée à l'extrémité d'un aptamère avant et après addition de la IFN- γ ; A : Voltampérogrammes de la sonde redox en fonction de la concentration en IFN- γ ; B report de $\Delta I = I_{C=0} - I_C$ en fonction de la concentration en IFN- γ . [46]**



en IFN- γ , et d'autre part la différence de courant enregistrée en absence et en présence de protéine ($\Delta I = I_{C=0} - I_C$ où C représente la concentration en IFN- γ), en fonction de la concentration en IFN- γ . Les auteurs ont également pu montrer la sélectivité de leur aptamère en reproduisant les courbes de la figure 1.9 pour d'autres protéines non spécifiques ($\Delta I = 0$).

La détection de molécules biologiques *via* l'utilisation d'une sonde redox est largement répandue. Cependant, dans certains cas, il s'avère difficile ou peu souhaitable de modifier le motif sonde avec une sonde redox. L'évolution de la surface d'une électrode peut alors être étudié *via* la résistance du transfert électronique entre la surface de l'électrode et une sonde redox en solution. [47] Un des exemples bien connus illustrant cette méthodologie concerne la détection de l'hybridation de brins d'ADN par la spectroscopie d'impédance électro-

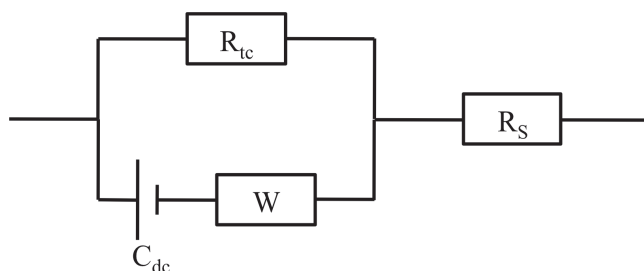
chimique. [48, 49, 50, 51, 52] En effet, si on considère l'interface électrode-électrolyte, deux phénomènes distincts assurent le passage du courant :

- La variation linéaire de la charge interfaciale en fonction du surpotentiel appliqué à l'électrode de travail est à l'origine du passage d'un courant capacitif ($I_{capa} = C_{dc}V$). La production d'une réaction électrochimique est à l'origine d'un transfert électronique au niveau de la double couche compacte qui assure le passage d'un courant faradique ($I_F = dQ_F/dt$ et $Q_F = n_e F$).

- Le courant effectif qui circule à l'interface électrode-électrolyte est la somme du courant faradique et du courant capacitif : $I = I_{capa} + I_F$

Pour rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes, le comportement électronique de l'interface électrode-électrolyte est équivalent à celui d'un circuit parallèle $R_{tc}C_{dc}$. Où R_{tc} est la résistance électronique au transfert de charge dans la double couche compacte au cours de la production d'une réaction électrochimique. Et C_{dc} représente la capacité de la double couche compacte résultante de l'accumulation de charge au cours de l'électrification de la surface du matériau d'électrode.

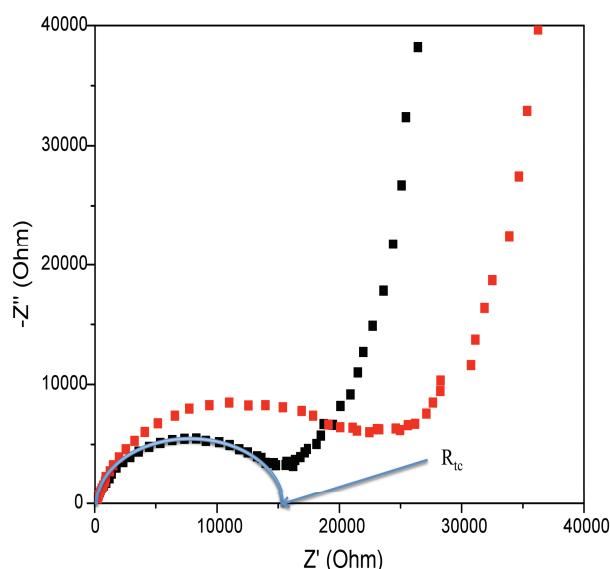
FIGURE 1.10 – **Schéma d'un circuit électrique équivalent décrivant l'interface électrode - électrolyte**



Il faut également ajouter, à ce circuit équivalent, une résistance R_s en série pour tenir compte de la résistance du dispositif de mesure (résistance interne de la cellule trois doigts). R_s est la somme de la résistance du matériau d'électrode et de celle de l'électrolyte (cf. circuit équivalent figure 1.10). Ainsi, en se basant sur ces principes, la spectroscopie d'impédance électrochimique va permettre de rendre compte de la dynamique de la réaction redox s'opérant à la

surface de l'électrode. On pourra ainsi la représenter par un circuit électrique équivalent.

FIGURE 1.11 – *Diagrammes de Nyquist d'impédance électrochimique en mode Faradique d'une surface de copolymère en présence d'une solution de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ enregistrés après (courbe noire) modification par des simples brins d'ADN et après (courbe rouge) hybridation de brins d'ADN complémentaires, pour une gamme de fréquences allant de 100 kHz à 0,1 Hz. [53]*



Ainsi, dans le cas de l'ADN, celui-ci étant chargé négativement, il est possible, en présence d'une sonde redox chargée négativement, de mesurer l'effet de répulsion engendrée par les charges de l'ADN. L'ADN étant fixé à la surface de l'électrode et la sonde redox en solution, cette dernière sera de plus en plus expulsée de la surface à mesure que la concentration en ADN et donc en charge négative augmentera sur la surface. Il est ainsi possible de détecter l'hybridation de l'ADN en mesurant la résistance de transfert électronique entre l'électrode et la sonde redox par spectroscopie d'impédance électrochimique due à l'augmentation de charge sur la surface de l'électrode (cf. figure 1.11) Il a également pu être démontré, par la spectroscopie d'impédance électrochimique, que l'on pouvait constater des changements de résistance et de capacité due à l'hybridation de l'ADN sans avoir recours à des sondes redox.

Pour ce faire, on fait de la spectroscopie d'impédance électrochimique en mode non-Faradique (on se base uniquement sur le courant capacitif et le mouvement des charges de surface). [53]

1.3.2 Optique et Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Après l'utilisation du courant électrique *via* une électrode comme transducteur, la seconde méthode de mesure que l'on retrouve dans la littérature pour les biocapteurs, est la mesure de signaux optiques résultants de l'interaction entre le motif sonde et l'analyte cible. En effet, la lumière et l'énergie qu'elle porte permet de rentrer en interaction avec la matière. Ainsi, suite à l'interaction lumière-matière, il en résulte un changement dans la lumière récupérée ; ce changement est vérifiable sur la longueur d'onde, son énergie, sa phase ou encore sa polarité. Chacun de ces changements permet de renseigner sur la nature de l'interaction lumière-matière, mais également de détecter la présence de molécules ayant une interaction spécifique avec la lumière. On retrouve principalement l'utilisation de cinq méthodes différentes se fondant sur différents types de signaux optiques : l'absorbance/réflectance, la luminescence, la chimiluminescence, les ondes évanescentes ou encore la résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance). On peut également noter d'autres exemples tirés des avancées techniques faits en optique linéaire et non-linéaire, comme l'interférométrie, la spectroscopie photoacoustique, la polarimétrie ou encore les méthodes de diffraction. [54]

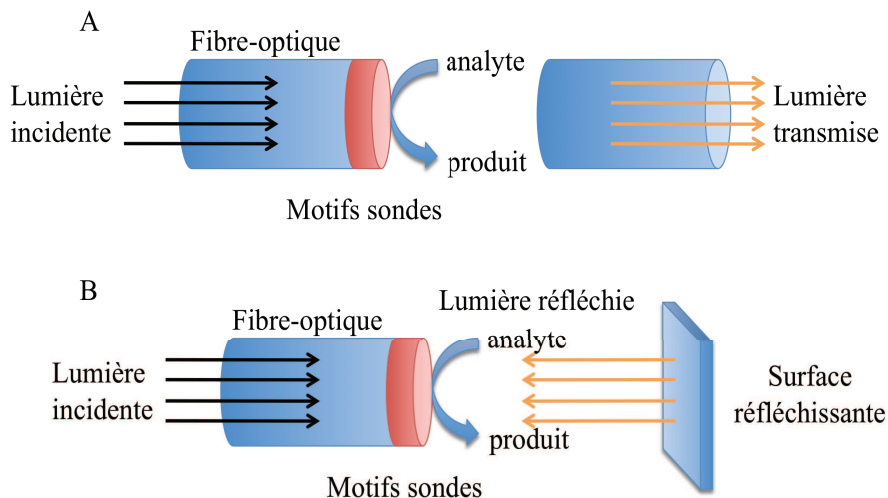
Absorbance - Réflectance

Parmi ces signaux, on retrouve la mesure d'absorbance/réflectance basée sur la loi de Beer-Lambert : $\log(I_0/I) = A = \epsilon Cl$, où I_0 est l'intensité de la lumière incidente, I est la l'intensité de la lumière transmise, A l'absorbance, ϵ est l'absorbance molaire de l'analyte pour une longueur d'onde spécifique, C la concentration en analyte et l la longueur de la solution traversée par la lumière.

L'utilisation de ces biocapteurs intervient principalement quand l'analyte ou le produit possèdent un changement d'absorbance pour une longueur d'onde spécifique. Généralement, les biocapteurs par absorbance utilisent comme transducteur une simple fibre-optique en mode transmission ou en mode réflexion

(cf. schéma 1.12).

FIGURE 1.12 – **Schéma général de biocapteurs basés sur l'absorbance, A : mode transmission, B : mode réflexion [54]**



L'exemple le plus utilisé est celui du couple NAD^+/NADH qui peut intervenir dans des réactions enzymatiques : Nous pensons notamment à la transformation du pyruvate en L-lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase :



Dans ce cas, la NADH possède une forte bande d'absorbance avec un maximum situé à 340 nm, et NAD^+ n'absorbe pas la lumière pour cette longueur d'onde. On peut alors relier la concentration en pyruvate en solution avec la décroissance de la bande d'absorbance de NADH. [55]

Luminescence - Chimiluminescence

La luminescence caractérise la lumière émise par retour à un état de moindre énergie d'électrons excités. Selon le temps d'émission, on parle de fluorescence (10^{-9} à 10^{-6} s) ou de phosphorescence (10^{-3} à 10 s). La plupart des biocapteurs utilisant la luminescence sont basés sur l'intensité ou le temps de vie de molécules organiques fluorescentes. L'intensité de luminescence peut être

reliée à la concentration en analyte par l'équation de Parker :

$$L = 2,31I_0\phi\epsilon Clk \quad (1.7)$$

Où, L est l'intensité de luminescence, I_0 est l'intensité de la lumière d'excitation, ϕ est le rendement quantique de luminescence, ϵ est l'absorbance molaire de l'analyte à une longueur d'onde donnée, C la concentration de l'analyte, l est la longueur que traverse la lumière en solution et k est une constante dépendante de l'instrument de mesure.

Le dispositif de mesure est équivalent à celui de l'absorbance (cf. figure 1.12). Dans ce cas, la lumière émise vient exciter les électrons des marqueurs fluorescents qui émettent alors de la fluorescence. Celle-ci sera alors mesurée par un détecteur adéquat (élimination de la source d'excitation, pour récupérer uniquement le signal émis).

Ainsi, en fonction des changements dans l'émission de la fluorescence, on peut être renseigné sur la concentration *via* l'intensité, mais également sur l'affinité *via* des variations dans la polarisation de la fluorescence émise. La polarisation permet également de rendre compte de la mobilité des molécules en analysant la dépolarisation (anisotropie de fluorescence) de la fluorescence. Dernièrement, on peut noter les techniques de FRET (pour "Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui sont basées sur le transfert d'énergie entre deux sondes fluorescentes. En effet, il est possible de transférer l'énergie de fluorescence d'une molécule à une autre quand celles-ci se trouvent proches l'une de l'autre (distance de l'ordre de la dizaine de nanomètres). Pour ce faire, on excite une première molécule fluorescente (donneur) dont le spectre d'émission se trouve dans le spectre d'excitation d'une seconde molécule fluorescente (accepteur). Quand les deux molécules sont suffisamment proches, il y a transfert d'énergie. La proximité nécessaire pour le transfert d'énergie permet d'obtenir des informations sur le couplage des deux entités, mais également sur leurs conformations. Cette technique est principalement utilisée pour l'étude des interactions protéine / protéine et ADN / protéine. [56]

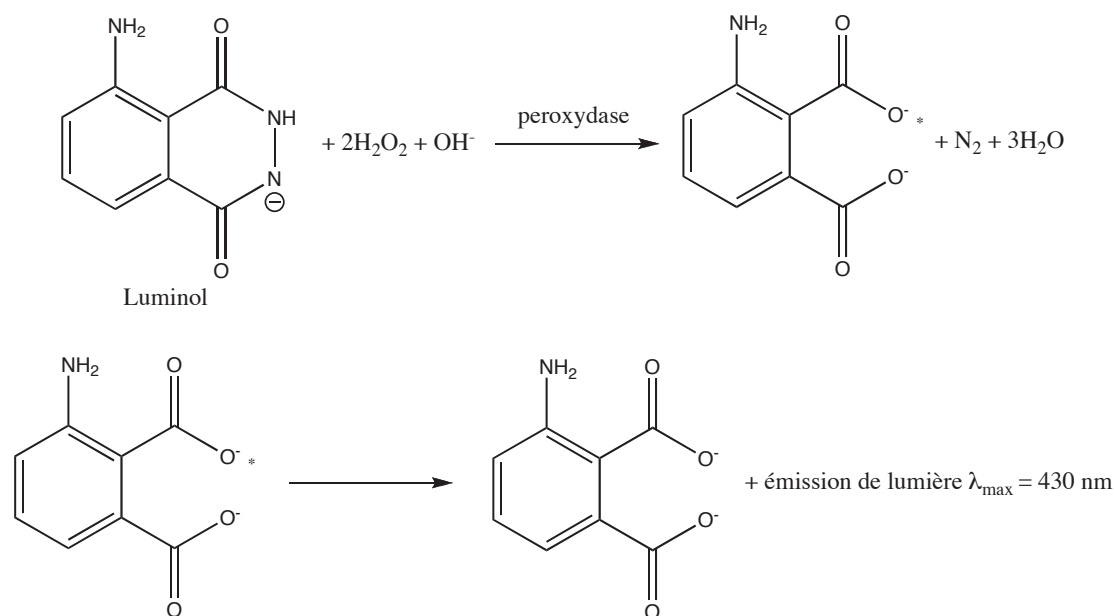
On peut également noter dans la luminescence, l'émission de lumière due à une réaction chimique (et non pas due à l'excitation par une source lumineuse). Ce type d'émission de lumière est appelée chimiluminescence. La réac-

tion qui en découle peut être résumée de la façon suivante :



Ce genre de biocapteurs est développé généralement pour des biocapteurs à base d'enzymes, par exemple, pour la détection du luminol. Dans ce cas, l'oxydation du luminol par H_2O_2 est catalysée par une peroxydase, pour donner une espèce émettant de la lumière. On pourra alors quantifier *via* l'intensité lumineuse, la quantité de luminol en solution (cf figure 1.13). [57]

FIGURE 1.13 – **Schéma réactionnel de l'oxydation du luminol par H_2O_2 catalysé par une peroxydase - réaction de chimiluminescence [57]**



Résonance Plasmonique de Surface - SPR

La dernière approche optique que nous verrons est fondée sur l'effet de résonance plasmonique à la surface d'un métal en contact avec un diélectrique. En effet, à l'interface métal - diélectrique, il existe différents modes électro-

magnétiques correspondant à des ondes de surface ("plasmons de surface"). Il a été remarqué qu'une onde lumineuse incidente pouvait être couplée aux plasmons de surface. Ainsi, en appliquant une onde lumineuse incidente sur la face inférieure du métal, une onde évanescente est créée et se propage à travers le métal. Cette onde évanescente permet d'exciter un plasmon de surface à l'interface métal / diélectrique extérieur. L'excitation de plasmon de surface provoque une baisse énergétique dans le faisceau lumineux réfléchi provenant du signal incident lors de sa réflexion. Ainsi, en plaçant l'onde lumineuse à un angle de résonance (θ), il pourra être enregistré une chute d'intensité lumineuse. Il s'agit de l'interrogation angulaire, c'est la plus utilisée dans le domaine des biocapteurs (cf. figure 1.14). L'interrogation angulaire ($\Delta\theta$) consiste à suivre la position angulaire du minimum de réflectivité SPR à une longueur d'onde donnée selon l'équation suivante :

$$\sqrt{\epsilon_p} \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\Delta\theta) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega) \cdot \epsilon_s}{\epsilon_m(\omega) + \epsilon_s}} \quad (1.10)$$

Il a ainsi pu être montré, qu'en fonction de la présence d'objets mesurables (par exemple protéines, ADN), l'onde évanescente peut subir une perturbation. Cette perturbation diminue l'effet de résonance plasmonique de surface et se fait sentir dans l'onde lumineuse réfléchie. Il peut donc être relié à la réponse angulaire une variation du milieu proche de l'interface métal / diélectrique. Ce système est particulièrement utilisé pour l'étude d'adsorption de protéines sur une surface, ou encore pour des études d'interactions entre molécules biologiques (protéine / protéine, ADN / ADN, ADN / protéine, anti-corps / protéine, etc...). [58, 59, 60]

De plus, de part la sensibilité de la mesure et le fait qu'il est enregistré tout au long de la réaction la variation angulaire du signal réfléchi, il est alors possible d'avoir un suivi en temps réel de la réaction. Ainsi, après avoir reporté le schéma général du fonctionnement d'un SPR, il est reporté dans la figure 1.14-B la réflectance de la lumière réfléchie en fonction de l'angle enregistré. Cette mesure permet de rendre compte au minimum de la courbe la variation de l'angle ($\Delta\theta_{SPR}$) entre la courbe de base et la courbe obtenue au début de l'adsorption d'une protéine sur la surface. On peut donc à partir de cette mesure, reporter la variation de l'angle en fonction du temps de la réaction, et ainsi, en suivre chaque étape de la réaction. Par exemple, dans la

FIGURE 1.14 – **Schéma général du fonctionnement d'un SPR pour la mesure d'adsorption de protéine sur une surface**; A : schéma général du montage SPR; B : Interrogation angulaire suite à un changement d'état de la surface, avant (noire) et après (rouge) adsorption de protéines; C : Report de l'interrogation angulaire en fonction du temps, après ajout d'une solution de protéine puis après rinçage de la surface. [61]

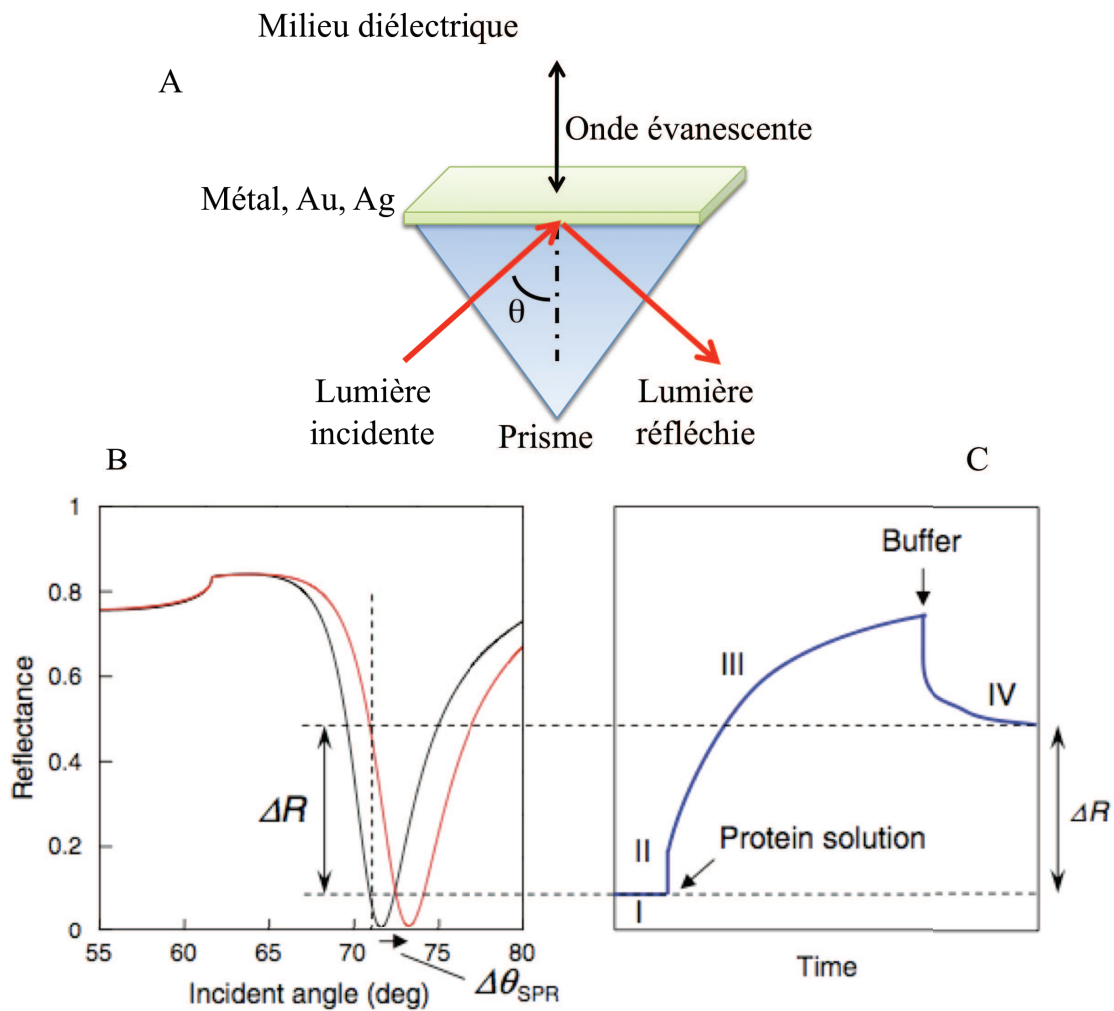


figure 1.14-C est reporté la réponse SPR au cours du temps. La première partie de la courbe représente la ligne de base du système, ensuite est injecté une solution de protéines qui s'adsorbent sur la surface, on obtient alors une

augmentation de la réponse jusqu'à saturation du système. Enfin, dans une dernière phase, la surface est rincée par un flux de solution tampon. Il est alors constaté une diminution de la réponse, ce qui est attribué au départ de protéines non adsorbées sur la surface. On peut également noter que dans le cas de l'interaction ADN / Protéine, la première phase montante de la réponse permet généralement d'obtenir la constante d'association (K_a) et que la phase de rinçage (dissociation du complexe formé) permet d'obtenir la constante correspondante (K_d).

1.3.3 Microbalance à Cristal de Quartz - QCM

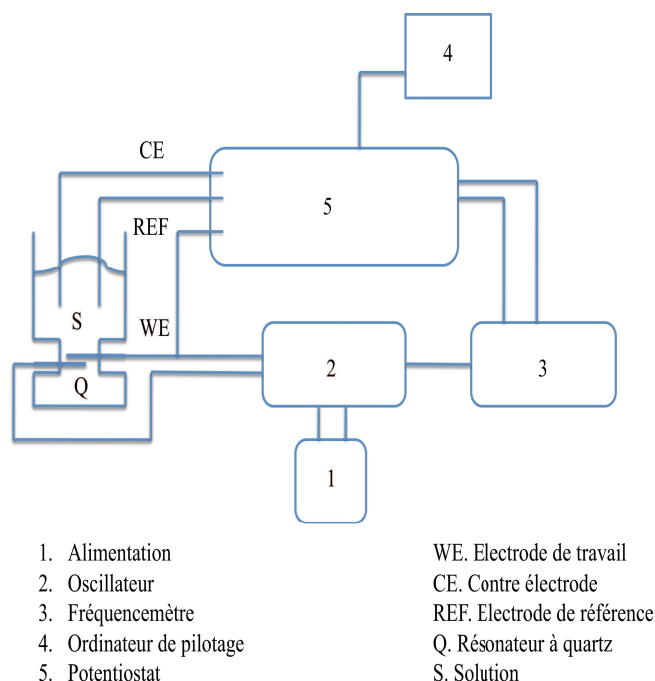
La microbalance (ou nanobalance) à cristal de quartz (MCQ, QCM en anglais ou E-QCM quand elle est couplée à un système électrochimique) est un instrument de haute précision permettant de mesurer les variations de masse à la surface d'une électrode (cf. schéma général d'un montage E-QCM Figure 1.15). Le terme de microbalance (ou nanobalance) provient de la sensibilité de cet instrument puisque celle-ci se situe bien en dessous du microgramme. En effet, la microbalance offre une sensibilité de l'ordre du nanogramme. Cette méthode permet la réalisation de mesures dans des milieux variés, notamment les milieux liquides. Un autre avantage de cette technique de mesure réside dans le fait que la précision résulte dans la géométrie du capteur, appelé résonateur, et de l'électronique qui mesure les variations de propriété du capteur, ceci rend l'étalonnage à priori inutile. La microbalance à cristal de quartz est un dispositif de mesure basé sur les propriétés piézo-électriques du quartz. Sauerbrey fut, en 1959, le premier à montrer que la variation de la fréquence d'un cristal de quartz (Δf_m) est une fonction linéaire de la variation de masse (Δm_s) selon l'équation suivante :

$$\Delta f_m = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m_s}{S} \quad (1.11)$$

Où f_0 (en Hz) est la fréquence de résonance fondamentale du quartz, S l'aire de l'électrode (en cm^2), N le rang de l'harmonique (avec $N = 1, 3, 5, 7, \dots$), ρ_q la masse volumique du quartz (en g.cm^{-3}) et μ_q son module de cisaillement (en $\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Cette équation est uniquement valable pour les variations de faible masse (variation de 3% de la fréquence initiale). On remarque également (d'après l'équation 1.11) qu'à une variation positive de la fréquence de vibra-

tion, correspond une diminution de la variation de masse et, réciproquement, une variation négative de la fréquence de vibration correspond à une augmentation de la variation de masse.

FIGURE 1.15 – **Schéma général d'un montage E-QCM**

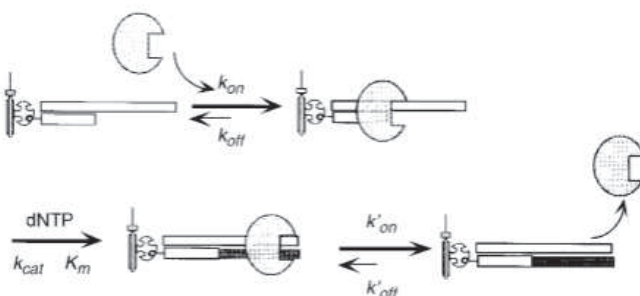


Il a également pu être démontré que la variation de la fréquence du quartz est aussi dépendante de la température, de la pression ou encore de la viscosité du milieu. Pour chaque phénomène il existe un $\Delta f_{correction}$ permettant d'intégrer ces changements au cours d'un suivi de la variation de la fréquence. [3] En outre, comme pour la SPR, cette technique permet un suivi en direct des événements se produisant à la surface de l'électrode du quartz.

Il devient alors possible, suite à la fixation de motifs sondes, de suivre la variation de la fréquence (et donc de la masse) provoquée par l'interaction entre l'analyte cible et son motif sonde. On peut ainsi étudier le mécanisme et la cinétique de différents événements biologiques tels que l'adsorption de protéines, les interactions protéine-protéine ou encore les interactions ADN-protéine *via*

le suivi de la variation de la fréquence du quartz. On utilise alors la relation de Sauerbrey (cf. equation 1.11) en faisant l'hypothèse que les objets mesurés sont assimilables à de petites sphères rigides. De plus, il est possible, suite à une première réaction, d'ajouter d'autres composants à la suite d'une réaction biologique et ainsi de séparer chaque mécanisme. Le premier exemple qui illustre l'étude de mécanisme biologique (et cinétique) sur un cristal de quartz est représenté par le travail de Niikura *et al.* [38, 62] sur la reconstruction d'un double brin d'ADN par l'ADN-polymérase.

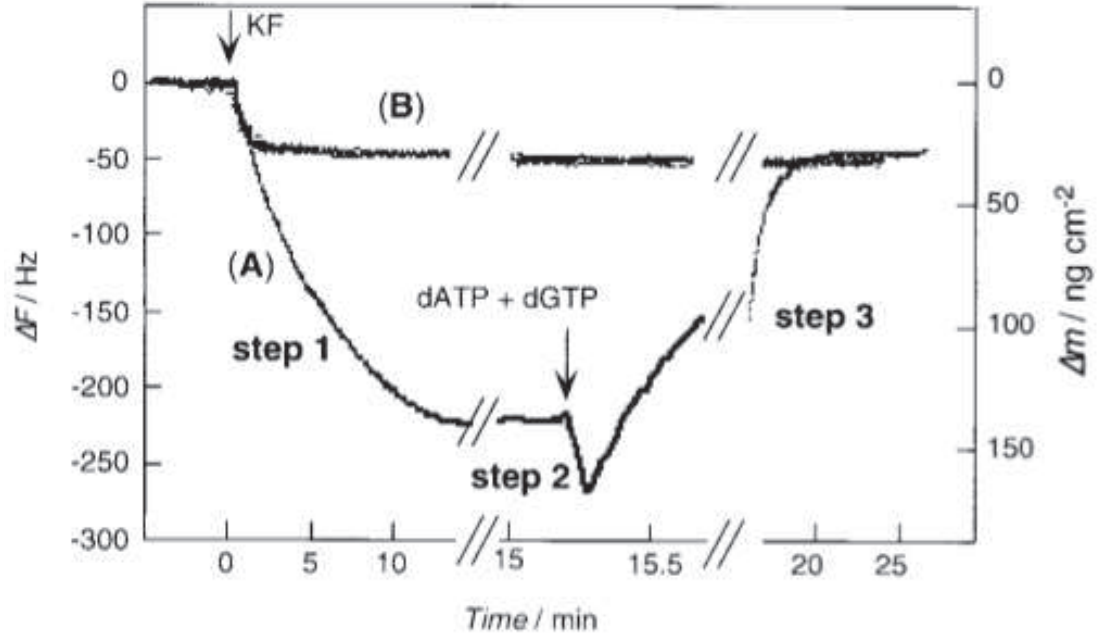
FIGURE 1.16 – **Schéma général de la reconstruction d'un double brin d'ADN par l'ADN-polymérase KF sur un cristal de quartz [62]**



Les auteurs ont en effet pu montrer qu'il était possible de suivre le mécanisme complet de reconstruction d'un ADN double brin par l'ADN-polymérase. Pour cela, une courte séquence d'ADN double brin avec en extrémité supérieure une partie simple brin (de 15 à 50 bases pour la partie simple brin) est fixée sur la surface de l'électrode du quartz. L'intersection double brin et simple brin de l'ADN fixé permet l'accroche de l'ADN-polymérase KF. Suite à l'accroche de cette enzyme, l'ajout de bases nucléiques (dNTP) permet *via* l'ADN-polymérase de reconstruire la partie manquante d'ADN double brin. La réaction se termine lorsque l'ADN-polymérase arrive à la fin de la partie simple brin, car à ce moment, l'enzyme se détache de l'ADN pour repartir en solution ou sur une autre séquence non reconstruite (cf. schéma général Figure 1.16). [62] La figure 1.17 représente le suivi *in situ* de la réaction biologique par la mesure de la variation de la fréquence en fonction du temps.

Dans cette figure, nous pouvons noter l'injection successive des différents

FIGURE 1.17 – **A : suivi de la variation de fréquence (masse) lors de l'injection successive de KF puis des dNTP ; B : suivi global de la variation de la fréquence (masse) lors de l'injection simultanée de KF et des dNTP** [62]



constituants nécessaires à la réaction complète dans l'ordre réactionnel imposé par le mécanisme (KF puis les dNTP, mécanisme en trois étapes). En premier est donc injecté l'ADN-polymérase KF qui vient se fixer à l'ADN se trouvant sur le support, cela se traduit par une diminution de la fréquence et donc par une prise de masse selon l'équation 1.11. En considérant cette partie (figure 1.17-A, step 1) de la réaction comme un équilibre, les auteurs ont considéré les équations suivantes :



$$+[\text{ADN/KF}]_t = [\text{ADN/KF}]_{\infty}(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (1.13)$$

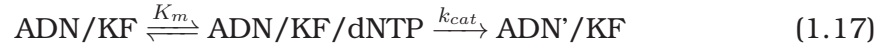
$$\Delta m_t = \Delta m_{\infty}(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (1.14)$$

$$\tau^{-1} = k_{on}[\text{KF}] + k_{off} \quad (1.15)$$

$$(1.16)$$

Ainsi, en modélisant l'équation 4.23 sur la courbe expérimentale de la figure 1.17 durant la première étape correspondant à l'injection de KF, on peut retrouver la valeur de τ^{-1} et cela pour différentes concentrations en KF. La collection de τ^{-1} pour différentes valeurs de concentrations en KF permet de retrouver les valeurs de k_{on} et de k_{off} représentant la cinétique de la première partie de la réaction.

La deuxième partie de la réaction représente la réaction enzymatique de l'ADN-polymérase, durant laquelle les dNTP sont additionnés pour reconstruire le double brin d'ADN. Cette réaction peut être suivie par la diminution de la variation de la fréquence (et donc la prise de masse) lors de l'étape 2 (figure 1.17-A, step 2). Ainsi, en considérant que la réaction suit un mécanisme de type Michaelis-Menten, on peut formuler la suite réactionnelle et les équations cinétiques suivantes :



$$v_0 = \frac{k_{cat}[\text{ADN/KF}]_0[\text{dNTP}]}{K_m + [\text{dNTP}]_0} \quad (1.18)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{k_{cat}[\text{ADN/KF}]_0[\text{dNTP}]} + \frac{1}{k_{cat}[\text{ADN/KF}]_0} \quad (1.19)$$

En représentant la courbe $v_0^{-1} = f([\text{dNTP}]_0^{-1})$, où v_0 est la vitesse initiale de la deuxième étape de la réaction, on peut retrouver grâce aux ordonnées à l'origine de cette fonction linéaire la constante de vitesse k_{cat} . La dernière partie de la réaction enzymatique de l'ADN-polymérase arrive lorsque les brins d'ADN sont entièrement reconstruits. L'ADN-polymérase se sépare de l'ADN pour repartir en solution. On peut visualiser cette étape sur la figure 1.17-A (step 3) dans la dernière partie de la courbe où nous observons une augmentation de la variation de la fréquence et donc une diminution de la variation de la masse (qui correspond au départ de la protéine de la surface). En considérant que cette dernière étape est un équilibre, les auteurs ont déterminé les relations suivantes :



$$-[\text{ADN/KF}]_t = -[\text{ADN/KF}]_\infty(1 - \exp(-t/\tau')) \quad (1.21)$$

$$-\Delta m_t = -\Delta m_\infty(1 - \exp(-t\tau')) \quad (1.22)$$

$$\tau'^{-1} = k'_{on}[\text{KF}] + k'_{off} \quad (1.23)$$

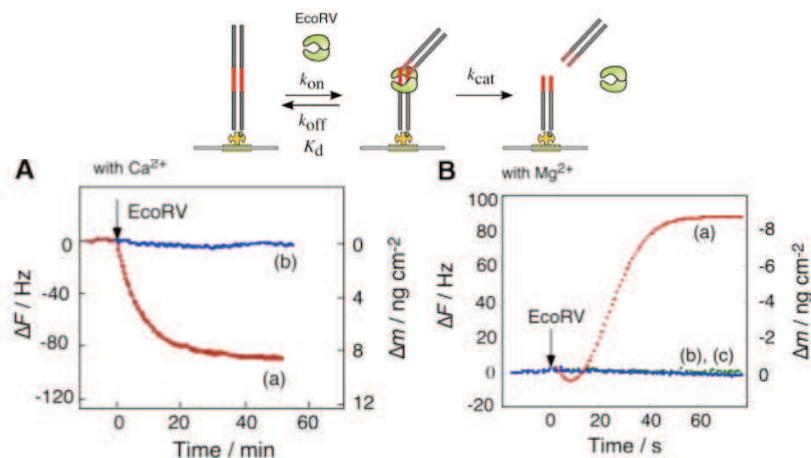
On peut alors (de la même façon que pour la première série de réaction), tracer le $\tau^{-1} = f([KF])$ introduit au départ de la réaction et ainsi déterminer les dernières constantes de vitesse k'_{on} et de k'_{off} . On peut également remarquer pour la figure 1.17-A le bilan massique à la fin de la réaction correspond au même bilan massique que la figure 1.17-B lorsque l'on ajoute tous les composants de la réaction (avec les mêmes concentrations) en même temps. Dans le suivi de la réaction de la figure 1.17-B on constate une unique augmentation de la masse qui correspond à tout instant au bilan de la réaction de polymérisation des bases nucléiques (fixation de KF - ajout dNTP - départ de KF).

Depuis ces premiers travaux sur la réaction de polymérisation des bases nucléiques par l'ADN-polymérase *via* la microbalance à cristal de quartz on peut retrouver d'autres études telles que la réaction enzymatique de coupure de double brin d'ADN par EcoRV/II (endonucléase, cf figure 1.18). [63, 64]

La protéine EcoRV se fixe en premier lieu spécifiquement à une séquence d'ADNdb. Une fois complexée, la protéine catalyse la coupure enzymatique de l'ADNdb. Pour ce faire, il est nécessaire d'être en présence d'un co-facteur de type cation métallique divalent (Mg^{2+}). Ainsi, les auteurs ont utilisé différents co-facteur pour mettre en avant soit la fixation de la protéine, soit la coupure enzymatique. Dans la figure 1.18-A, l'ajout de la protéine se fait en présence de Ca^{2+} , nous constatons une unique prise de masse qui correspond à la formation du complexe EcoRV / ADNdb. Au contraire, dans la figure 1.18-B, l'ajout de la protéine se en fait en présence de Mg^{2+} . Nous constatons dans un premier temps une très légère prise de masse qui est principalement suivie par une grande perte de masse. Cette suite de prise et perte de masse correspond en premier lieu à la formation du complexe EcoRV / ADNdb puis à la coupure enzymatique se qui traduit une perte de matériel biologique sur la surface, d'où une perte de masse. Ensuite, nous pouvons également remarquer que la perte de masse est plus conséquente que la prise, cela peut s'expliquer en supposant que la vitesse de la réaction de coupure est plus rapide que la vitesse de la réaction de fixation. Ce qui implique qu'en moyenne, on observe sur la surface plus de réactions de coupure que de formations de complexes. Les auteurs ont également pu montrer qu'en faisant varier la concentration en protéine initiale et en présence de Mg^{2+} , on peut favoriser la formation du complexe ou la coupure enzymatique, ce qui se traduit soit par une plus forte

prise de masse au départ, soit par directement une perte de masse (sans prise de masse au départ).

FIGURE 1.18 – **Schéma réactionnel de la coupure spécifique d'un double brin d'ADN par l'enzyme de restriction EcoRV**; A : suivi de la variation de la fréquence/masse lors de l'ajout de EcoRV en présence de Ca^{2+} ; B : suivi de la variation de la fréquence/masse lors de l'ajout de EcoRV en présence de Mg^{2+} [63]



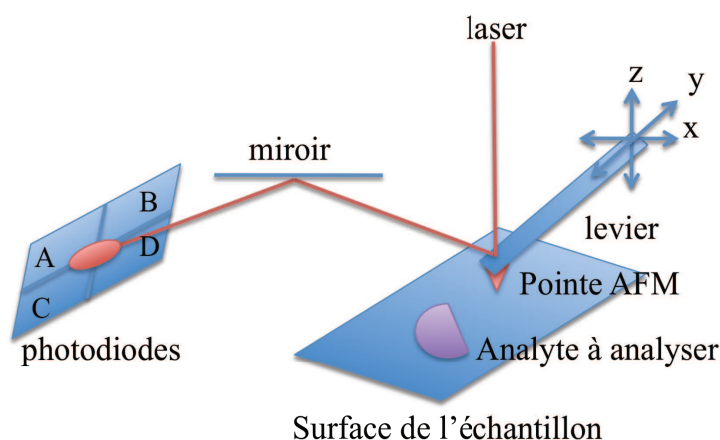
1.3.4 Microscopie à Force Atomique - AFM

Nous avons vu jusqu'à présent l'utilisation de technique permettant de détecter la présence ou les cinétiques réactionnelles de molécules biologiques. Or, particulièrement dans le cas des études de cinétiques, il peut être nécessaire d'avoir d'une part une idée des forces des interactions entre biomolécules, et d'autre part d'accéder aux images des complexes biologiques, permettant alors de valider les mécanismes et d'affiner ainsi les études cinétiques. Le meilleur outil à notre disposition pour remplir cette fonction est la Microscopie à Force Atomique (AFM pour "Atomic Force Microscopy").

Le principe général de l'AFM est la mesure des différentes forces d'interaction entre une pointe idéalement atomique fixée à l'extrémité d'un bras levier et les atomes de la surface d'un matériau (forces de répulsion ionique, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques...). Ainsi, cette technique permet d'avoir une analyse topographique

tridimensionnelle des surfaces étudiées, avec une très haute résolution pouvant aller jusqu'à la résolution atomique. Elle permet également de donner des informations sur les propriétés de surface (propriétés viscoélastiques, mesure de forces d'adhésion, possibilité d'imager les composantes magnétiques et électriques...).

FIGURE 1.19 – **Schéma général de fonctionnement d'un appareil de Microscopie à Force Atomique**

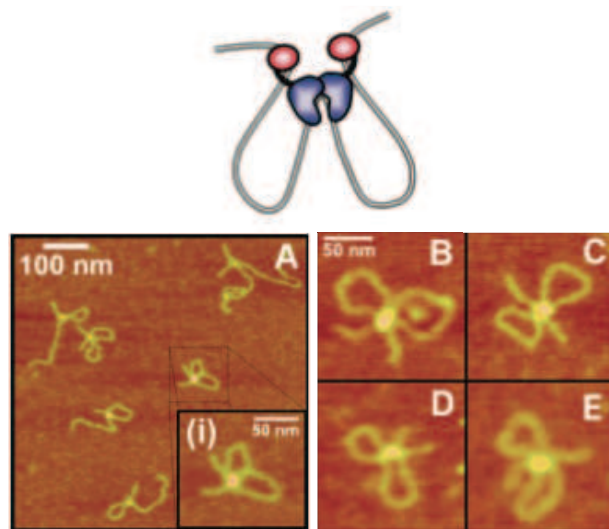


Les forces ainsi appliquées à la pointe sont retransmises dans le levier qui subira une déformation directement proportionnelle aux forces mises en jeu par la surface. Il existe donc une multitude de modes de déplacement de la pointe AFM permettant chacun de retransmettre une information particulière. On peut retenir parmi ces différents modes, le mode contact qui permet de rendre compte de la morphologie de la surface ou encore de mesurer les forces d'adhésion. On retrouve également les modes résonants qui permettent d'éviter que la pointe ne touche la surface et ne soit endommagée. Dans ces modes, on retrouve aussi le mode tapping, le mode contraste de phase, la microscopie à force magnétique ou électrostatique. On peut donc aisément avoir une retransmission des profils de la surface (que ce soit en mode contact ou non-contact/résonant) selon les trois directions de l'espace (xyz). On représente donc l'image de la surface selon (xy) et (z) est représenté par une variation du taux de couleurs.

L'utilisation de l'AFM dans le domaine de la biologie a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'acquisition d'informations structurales de biomolécules comme les propriétés physicochimiques. Pour pouvoir obtenir une image de complexes protéine-protéine ou protéine-ADN [65] il est nécessaire de déposer les complexes sur une surface possédant une rugosité inférieure à la taille des complexes. En pratique, on utilise des surfaces de Mica, celles-ci possèdent en effet une rugosité de l'ordre du plan atomique. De plus, pour obtenir une image de ces complexes, il est nécessaire que ceux-ci soient fixés à la surface. En effet, lorsque l'on balaye la surface avec la pointe que ce soit en mode contact ou non, si les complexes ne sont pas fixes, ceux-ci peuvent être emportés par la pointe et ne pas être visualisés. La méthode principale est l'adsorption physique des complexes sur la surface. Dans le cas d'un complexe ADN-protéine, l'ADN est pré-adsorbé sur la surface que l'on fera ensuite réagir avec la protéine, ou alors le complexe sera préalablement formé en solution puis adsorbé à la surface de Mica. Ce genre de modification nécessite généralement des traitements de la surface (et/ou du complexe) pour permettre l'adsorption (souvent par des cations métalliques Mg^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} et Zr^{4+} [66]). De plus en plus de techniques de modification de surface formant des mono-couches organiques sont développées actuellement pour fixer de manière covalente les complexes (cf. section 2.1). L'AFM autorise la visualisation des objets avec une résolution quasi atomique, ce qui permet d'obtenir des images tridimensionnelles de complexes biologiques et de le relier à un modèle adéquat. Par exemple, dans le cas de la protéine EcoRII qui se fixe de façon spécifique à son site d'excision, les auteurs Shlyakthenko *et al.* [67] ont pu à partir d'images AFM reconstruire un modèle de fixation de la protéine à l'ADN double brin.

On remarque figure 1.20 des images du complexe EcoRII/ADNdb qui montrent, au centre de la boucle formée par l'ADN (trait fin) une boule correspondant à la protéine. Puis à partir du volume occupé par la protéine et à la forme même de celle-ci, puis à la forme de l'ADN enroulée autour de la protéine. Les auteurs ont ainsi pu reconstruire, à partir de ce que l'on connaît de la biochimie de la protéine et de la connaissance de ses propres sites de fixation à l'ADNdb, un modèle de complexation et la formation de deux boucles de l'ADNdb avec une partie centrale contenant un dimère de la protéine nécessaire à cet enroulement. On peut alors rapidement voir que le fait de coupler la microscopie à

FIGURE 1.20 – **Visualisation par Microscopie à Force Atomique de complexes EcoRII/ADN sur une surface de Mica permettant de modéliser une représentation du complexe protéique[67]**

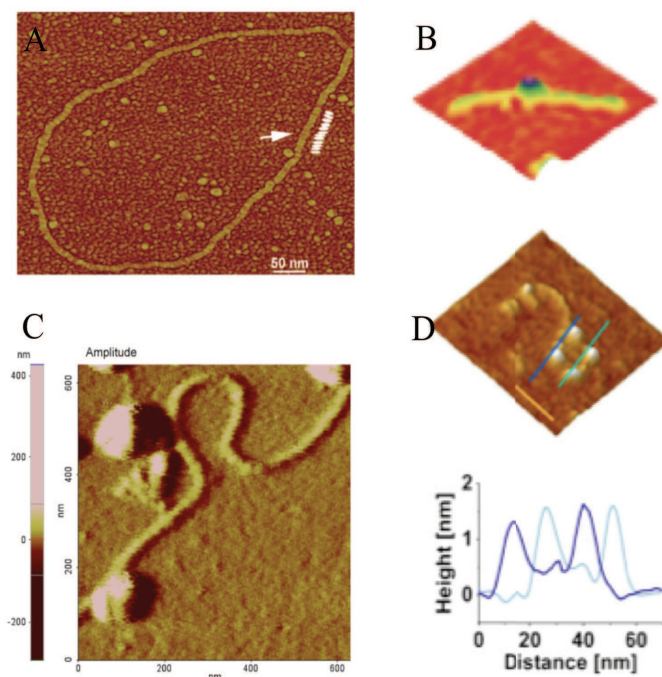


force atomique avec des mesures de cinétiques peut permettre de remonter à un mécanisme complet de la fixation d'une protéine à l'ADN.

On peut ainsi retrouver dans la littérature un grand nombre d'exemples de visualisation de complexes protéiques possédant un ou plusieurs sites de fixations (Rad50 [68], Histone [69, 70], RecA [71], NF- κ B [72], cf. figure 1.21, etc...). En outre, cette approche peut permettre, contrairement à des techniques beaucoup plus coûteuses en temps et en protéines comme la cristallographie par rayons X, d'obtenir rapidement des images de complexes et ainsi de mieux appréhender les mécanismes de formation de ces complexes.

De plus, les récents développements de l'AFM peuvent en outre permettre le suivi d'une surface en temps-réel. En effet, avec un AFM haute vitesse, il est possible de suivre l'évolution d'une surface au cours du temps. Ainsi, il a été montré qu'il était possible de suivre l'évolution de la dissociation d'un filament de Rad51 au cours du temps jusqu'à retrouver le simple brin d'ADN servant de matrice au complexe protéique. De même, grâce aux évolutions optiques, il est possible de coupler la microscopie de fluorescence avec l'AFM. Il

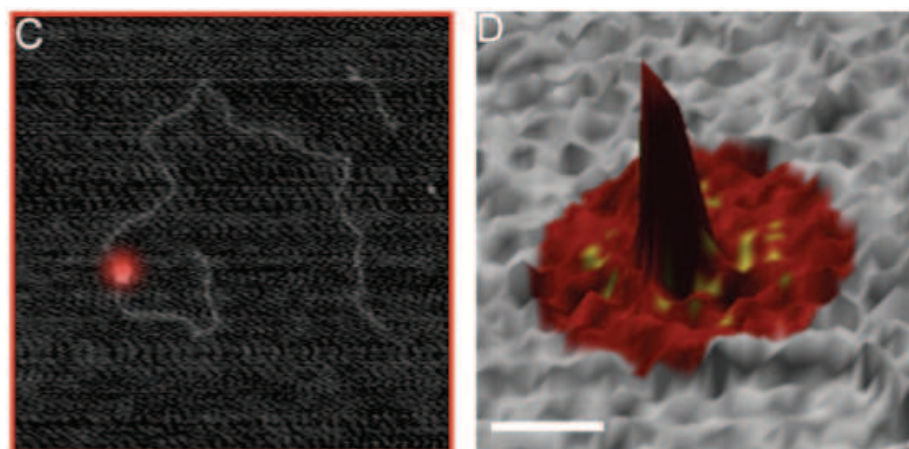
FIGURE 1.21 – *Exemple de différent type de complexes protéines/ADN observable par la microscopie à force atomique, A : visualisation d'un plasmide circulaire recouvert d'un filament de RecA[71], B : visualisation d'un dimère de Rad50 [68], C : visualisation de complexes NF- κ B [72], D : visualisation de complexe à base d'Histone[70]*



peut en effet être difficile de distinguer une protéine d'une autre lorsque l'on se retrouve dans des échelles atomiques. Pour cela, il a été développé des techniques couplant l'approche optique par détection de protéine marquée par de la fluorescence et la microscopie à force atomique pour l'aspect tridimensionnelle et de la taille des complexes (cf figure 1.22). [73]

De plus, outre les avancées technologiques sur l'appareil AFM en lui-même, des avancées ont pu être faites au niveau de la pointe utilisée pour faire ces images. En effet, il a pu être montré qu'il était possible de modifier spécifiquement l'extrémité d'une pointe par des molécules biologiques. [74] Ainsi, lorsque la pointe s'approche d'une surface possédant des molécules biologiques, elles peuvent interagir avec la molécule biologique fixée à l'extrémité de la pointe.

FIGURE 1.22 – *Couplage d'une visualisation par microscopie optique de la fluorescence (en rouge) d'une protéine avec une image AFM, représentation en trois dimensions du complexe protéine/ADN (protéine en rouge)* [73]



On peut alors faire différentes mesures :

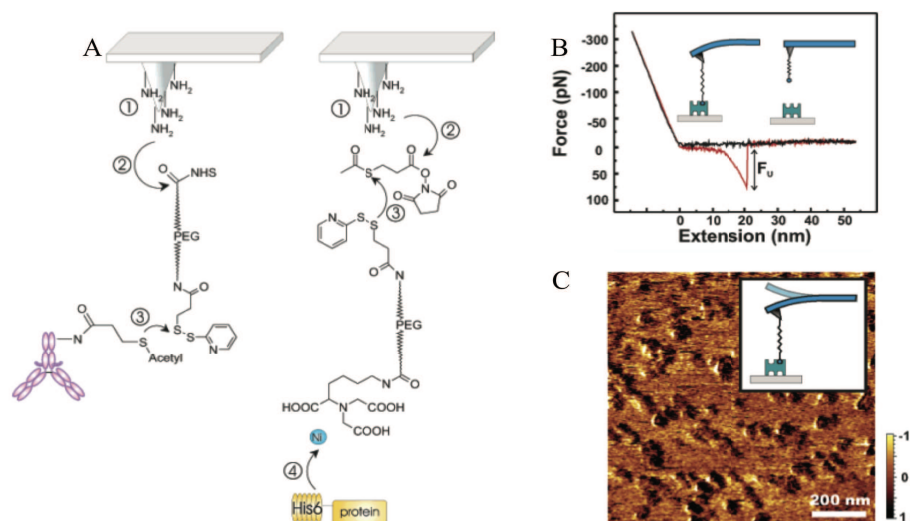
- La première est la mesure de la force d'interaction qu'il existe entre la molécule de la pointe et la molécule de la surface. Pour cela, on effectue des courbes d'approche de la pointe et on mesure la force en retour. Tout particulièrement, la force lorsque la pointe remonte de la surface, correspondra à la force même de l'interaction entre les deux molécules biologiques.

- La deuxième mesure permettra *via* cette même force d'interaction, qui existe entre les molécules biologiques, de balayer la surface pour en faire une image topographique spécifique aux molécules de la surface interagissant avec la molécule de la pointe (cf figure 1.23).[74]

1.4 Conclusion du Chapitre 1

Nous avons pu voir à travers ce chapitre que, quel que soit l'analyte ciblé, il lui correspond un motif sonde spécifique donnant après interaction un signal de différentes natures (chimique, physique, biologique). Ce signal est alors transmis à un transducteur *via* le biorécepteur, permettant alors l'ana-

FIGURE 1.23 – **A : Différentes modifications de pointe AFM pour l'accroche d'anticorps ou de protéines ; B : Mesure de forces résultant de l'interaction spécifique entre une pointe modifiée par une molécule biologique avec une molécule biologique se trouvant sur une surface ; C : Image AFM de reconnaissance spécifique de molécules biologiques via une pointe AFM modifiée par une molécule biologique [74]**



lyse du signal. Celui-ci pourra être relié à l'analyte cible (concentration, cinétique, etc...). Au vu de la quantité d'analytes détectés par les biocapteurs, seules l'imagination et la nécessité d'un biocapteur peuvent limiter sa réalisation. De surcroît, nous pouvons voir que le biorécepteur possède un rôle central dans l'obtention d'un biocapteur compétitif, car il permettra une bonne transmission du signal.

Dans ce cadre, actuellement, on retrouve beaucoup d'étude sur la conception de surfaces pouvant immobiliser les motifs sondes. L'un des principaux objectifs est de concevoir une modification de surfaces rassemblant les différents points suivant :

- l'immobilisation spécifique d'un motif sonde réalisée à l'aide d'une fonction d'ancrage particulière correspondant à un groupement du motif sonde.
- une modification de surface pouvant être appliquée à différents types de support pour pouvoir y appliquer différentes techniques.

- elle ne doit pas dégrader le signal émis lors de l'interaction entre l'analyte cible et le motif sonde.

- le biocapteur doit également conserver au cours du temps toutes son intégrité et ses capacités de détection.

Dans le cas des biocapteurs permettant l'étude des interactions ADN / Protéines (cas, qui nous intéressera particulièrement dans les chapitres suivant) il est nécessaire d'adapter les modifications de surfaces notamment lorsqu'on utilise la QCM ou l'AFM :

- ces modifications doivent représenter une faible masse sur la surface. Par exemple, pour la QCM, la masse doit être très inférieure à la limite imposée par l'équation de Sauerbrey (3% de la fréquence du cristal de quartz). Il faut donc éviter de ne pas se retrouver hors limite lors de l'ajout des différents constituants lors des réactions de surfaces étudiées.

- elles doivent également être homogène sur l'ensemble de la surface, ce qui permet d'envisager une très faible rugosité et permettre ainsi la visualisation par AFM de complexes biologiques souvent compris entre 1 et 20 nm.

Pour le choix du transducteur, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'une technique permettant une analyse avec un suivi en temps-réel de la réaction biologique. Pour cela, les techniques de SPR ou de QCM semblent les plus adaptées. Malgré l'efficacité de la technique SPR, nous avons pris le parti d'utiliser la QCM, qui ne nécessite pas d'étalonnage au préalable de l'appareil, ce qui permet d'obtenir rapidement et efficacement une réponse en temps-réel de la réaction biologique. En effet, il nous semblait nécessaire de développer une surface pouvant facilement être modifiée et rapidement utilisée par des non physico-chimistes.

Ainsi, dans le chapitre 2, après avoir passé en revue différents types de modifications de surfaces, nous orienterons notre travail sur un type unique de modification de surface *via* la réduction électrochimique des sels d'aryl-diazonium. Nous pourrons ainsi intégrer une fonction d'ancrage spécifique à l'immobilisation de brin d'ADN.

Chapitre 2

Elaboration d'une surface spécifique à l'étude des interactions ADN / Protéines

Avant propos. Comme nous avons pu le voir dans le précédent chapitre, l'interface entre le motif sonde et le transducteur occupe une place importante dans l'efficacité d'un biocapteur. En effet, c'est à travers le biorécepteur que le motif sonde doit être immobilisé. En outre, celui-ci ne doit pas interférer dans la mesure du signal produit (dans certains, cas il pourra même le propager) lors de l'interaction entre l'analyte cible et le motif sonde. Ainsi, à travers la section 1.2, nous avons pu voir que les motifs sondes peuvent être immobilisés selon un grand nombre de procédures. Dans le cas de l'ADN, on retrouve principalement l'immobilisation par liaison covalente-affinité. [29] Notre objectif étant de posséder une liaison stable entre des surfaces variées et l'ADN, nous nous sommes concentrés sur la formation d'une couche organique possédant une fonction d'ancrage spécifique permettant l'immobilisation d'ADN par liaison covalente.

Au préalable, il est donc nécessaire de modifier la surface pour y intégrer la fonction d'ancrage spécifique au motif sonde (ADN). Il existe trois grandes familles de modifications de surfaces disponibles dans la littérature. La première est une méthode électrochimique consistant en la formation d'un polymère (conducteur ou non) à la surface d'une électrode. [75] A titre d'exemple, on peut noter celui cité dans la section 1.2, où un monomère modifié contenant le motif

biotine est électropolymérisé. [37] La deuxième approche concerne la modification de surface par des SAM (pour Self-Assembled Monolayer) qui consiste en l'adsorption spontanée de molécules possédant une extrémité ayant une grande affinité avec la surface. [76, 77] En revanche, ces deux dernières méthodes présentent des inconvénients. Dans le cas de l'électropolymérisation, il est généralement difficile d'obtenir une couche organique de faible épaisseur, ce qui est limitant dans le cas de l'utilisation de techniques de champs proches (comme l'AFM) et tout particulièrement dans le cas de la visualisation de complexes biologiques. Dans le cas des SAM, malgré leur grande utilisation et leur facilité de mise en place, ceux-ci restent peu stables dans le temps et en milieux oxydants. En parallèle, on retrouve une dernière famille de modification électrochimique de surface, l'électrogreffage. Cette dernière méthodologie, consiste en la production de radicaux à proximité d'une surface conductrice : on peut ainsi former une liaison covalente par chimisorption avec le métal. Dans ce cadre, on retrouve notamment la modification de surface faisant suite à la réduction électrochimique de sels d'aryldiazonium. Ainsi, depuis les années 1990, ce dernier type de modification connaît un grand essor, du fait de sa versatilité (réalisée sur surfaces variées), de sa facilité de mise en oeuvre et surtout de la possibilité d'introduire une grande variété de groupements dans la couche organique ainsi formée. La principale difficulté de mise en oeuvre, pour cette modification de surface, concerne le contrôle de l'épaisseur de couche (mono / multi-couches organiques déposées). [78]

Ainsi, dans un premier temps, nous verrons les différentes techniques de modifications de surfaces. Après avoir indiqué les avantages et inconvénients de chaque méthodologie, nous orienterons notre travail vers la modification de surfaces par réduction électrochimique de sels d'aryldiazonium. Comme indiqué précédemment cette modification devra remplir les différentes conditions imposées pour un biocapteur permettant l'étude de l'interaction ADN / protéine par analyse QCM et AMF (cf. conclusion chapitre 2).

Chaque étape de la modification sera caractérisée par différentes techniques comme la voltampérométrie cyclique, la QCM, l'XPS ou encore l'AFM. Une fois la modification de surface optimisée, nous la testerons pour l'immobilisation de l'ADN. Dans un premier temps, nous immobiliserons une simple molécule organique possédant une fonction électrochimiquement active pour

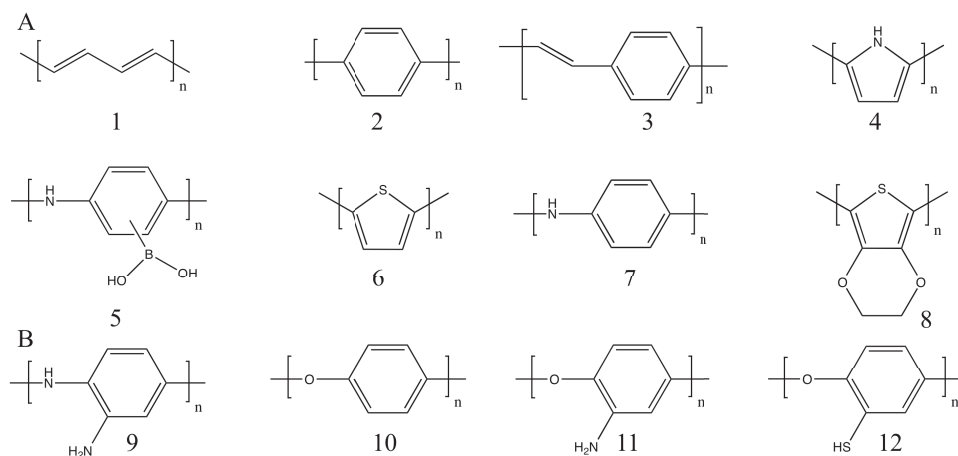
en vérifier la présence sur la surface. Puis, nous immobiliserons de l'ADN avec un suivi par QCM et une visualisation par AFM.

2.1 Fonctionnalisation de Surface

2.1.1 Electropolymérisation

L'électropolymérisation de monomères électroactifs permet de modifier une surface conductrice par physisorption d'un polymère conducteur ou non. Les principaux polymères ainsi obtenus sont représentés dans la figure 2.1.

FIGURE 2.1 – **Principales structures de polymères formés par électropolymérisation ; A Polymères électroniquement conducteurs : polyacétylène 1, polyphénylène 2, polyphénylènevinylène 3, polypyrrole 4, poly(acid aminophényleboronique) 5, polythiophène 6, polyaniline 7, polyéthylènedioxythiophène 8 ; B Polymères électroniquement non-conducteur : polyphénylènediamine 9, polyphénole 10, polyaminophénole 11, polythiophénole d'après Sharma et al. [75]**

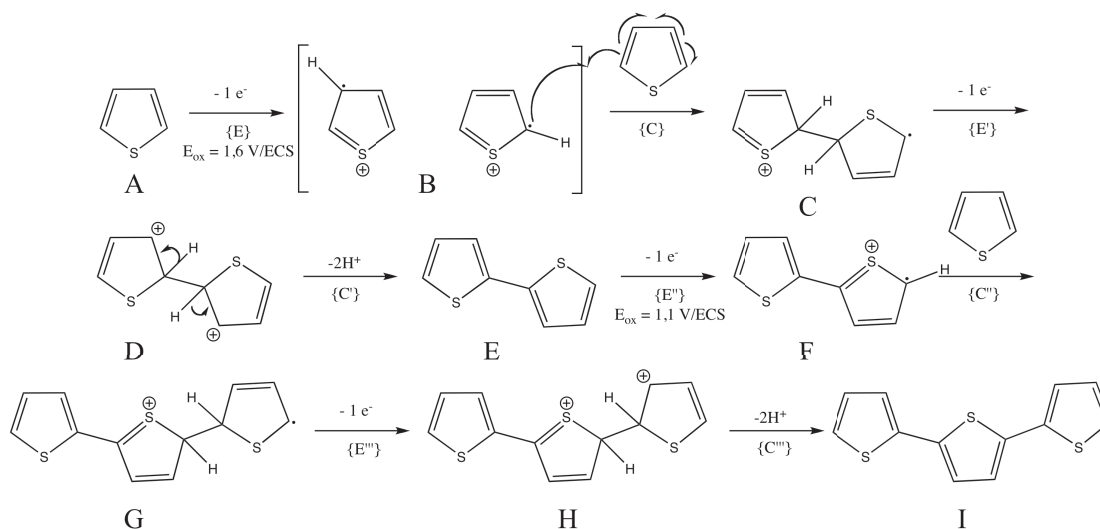


Depuis leurs premières synthèses et la démonstration de leurs potentialités conductrices, [79, 80] les polymères formés par électropolymérisation ont connus un grand essor. Ils ont démontré posséder des propriétés électroniques (magnétisme, conduction et optique) se rapprochant des métaux. Ils ont même été définis par le terme de "synthetic metals". [75] De plus, les méthodes de synthèses organiques ont permis d'obtenir, en plus des monomères représen-

tés dans la figure 2.1, une grande variété de monomères électroactifs. Ce qui a permis leur utilisation dans un grand nombre de domaines, et en particulier, celui des biocapteurs. La possibilité d'intégrer une fonction d'ancrage pour l'immobilisation par liaison covalente-affinité dans le monomère électroactif, en outre les propriétés conductrices du polymère formé, font de cette méthode un outil puissant pour les biocapteurs, dont le transducteur est une électrode.

La plupart des monomères électroactifs polymérisent par voie oxydante (chimique ou électrochimique). La voie électrochimique est privilégiée dans le cas de la formation de couches organiques conductrices à la surface d'une électrode, car elle permet de déposer directement sur la surface un polymère par physisorption. Bien que le mécanisme d'électropolymérisation ne soit pas complètement élucidé, nous pouvons néanmoins utiliser, à titre d'exemple, le mécanisme présenté dans la figure 2.2 pour décrire l'électropolymérisation du thiophène.

FIGURE 2.2 – **Mécanisme général de l'électropolymérisation du thiophène, potentiel enregistré par rapport à l'ECS (Electrode au Calomel Saturé) d'après Sharma et al. [75]**



La figure 2.2 présente le mécanisme général de l'électropolymérisation du thiophène (molécule A). Le processus d'électropolymérisation fait intervenir un

mécanisme de type ECEC (E pour réaction électrochimique et C pour réaction chimique). En partant donc du thiophène, on applique un potentiel électrochimique à l'électrode de travail, ainsi à 1,6 V par rapport à l'ECS (Electrode au Calomel Saturé), on oxyde le monomère *via* un processus à un électron pour donner un intermédiaire réactionnel de type radical cation (molécule B), cette étape représente le premier processus électrochimique E. En voltampérométrie cyclique, ce premier processus se traduit par la formation d'un pic dans les courants anodiques.

Une fois le radical cation formé, celui-ci réagit avec une seconde molécule de thiophène pour former un premier dimère chargé (molécule C). C'est le premier processus chimique C. Le fait que le radical cation réagisse avec une deuxième molécule de thiophène implique le côté irréversible de la première réaction électrochimique.

Une fois le dimère sous forme de radical cation obtenu, un second processus électrochimique d'oxydation à un électron permet de former l'espèce bi-cationique représentée par la molécule D. Les deux premières étapes se faisant très rapidement, le second processus électrochimique E' intervient dans la même vague d'oxydation que celle de l'oxydation du monomère.

Enfin, la forme bi-cationique retourne vers une forme non chargée suite au départ de deux protons, cela correspond au deuxième processus chimique C'. On obtient alors le dimère sous forme neutre représenté par la molécule E.

Les dimères formés étant insolubles, ils précipitent et sont alors adsorbés à la surface de l'électrode de travail. L'oxydation de ces dimères à +1,1 V/ECS permet d'obtenir un radical cation (molécule F). Ce nouveau radical cation peut de nouveau réagir avec une molécule de thiophène pour obtenir la molécule G. Celle-ci donnera un trimère de thiophène neutre (molécule H puis I) selon un nouveau processus électrochimique à un électron et après le départ de deux protons.

La force de cette réaction électrochimique de type ECE est la formation de molécules ayant des doubles liaisons couplées quand le polymère est sous sa forme chargée. En effet, la conjugaison des doubles liaisons pour ce type de molécules n'est pas possible sous la forme neutre. Les orbitales π ne se trouvent pas dans le même plan spatial. Ainsi, quand nous oxydons (par voie

électrochimique) le polymère selon un processus à deux électrons et deux protons, des charges sont créées localement le long de la chaîne polymère. Ces charges locales provoquent un changement de conformation locale de la structure et provoquent la conjugaison des liaisons π . Cette conjugaison permet un déplacement des charges ce qui conduit à une conduction électronique. Le potentiel électrochimique pour créer ce type de charges est compris entre +0,4 et +0,6 V/ECS. Le potentiel permettant la formation du polymère étant supérieur à +1 V/ECS, nous obtenons en réalité, à la fin de la réaction d'électropolymérisation, un polymère sous sa forme chargée. La forme neutre ne pourra alors être obtenue qu'après la réduction des charges en appliquant un potentiel inférieur à 0,4 V/ECS.

La modification de surface par le biais de l'électropolymérisation de monomères électroactifs permet d'intégrer un grand nombre de groupements sur la surface. Cette grande diversité, due au travail de synthèse, permet d'envisager l'immobilisation d'une grande variété de motifs sondes. Cependant, même si dans une certaine mesure, il est possible de contrôler la taille du polymère formé, celle-ci est généralement trop importante pour la visualisation par AFM de complexes biologiques. A titre d'exemple, nous pouvons retrouver dans les travaux de O'Neil *et al.* [81], une rugosité de l'ordre de 8,1 nm pour une épaisseur de couche de 60 nm dans le cas d'un poly(bithiophène). Or, les complexes de types ADN / protéines présentent des tailles comprises entre 2 et 20 nm.

Pour contourner le problème de la rugosité de surface imposée par la couche organique et aller vers la formation de couche organique de l'ordre de la monocouche, des techniques de modifications de surface comme les SAM (Self-Assembled Monolayer) ou encore l'électrogreffage ont été mises en avant dans la littérature. [76, 77, 78]

2.1.2 Les SAM

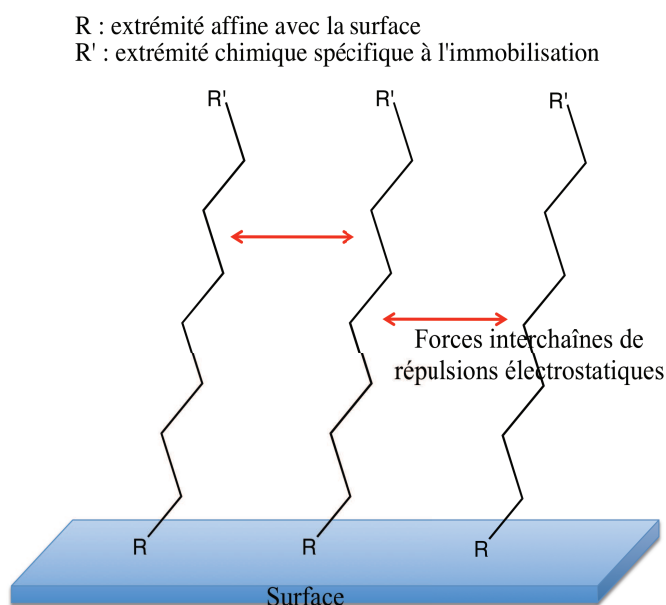
Construire des couches organiques sur une surface à l'échelle de la molécule requiert le contrôle de l'assemblage de molécules. La principale méthode conduisant à ce niveau d'organisation est réalisée en utilisant l'auto-assemblage moléculaire : SAM (pour "Self-Assembled Monolayers). Ainsi, quand les conditions requises sont présentes, il est possible de former spontanément sur une surface, un alignement de molécules organiques. Généralement, la

surface est simplement immergée dans une solution contenant les précurseurs modifiés, qui viennent automatiquement former une mono-couche organique sur la surface. Pour ce faire, ces précurseurs doivent présenter différentes caractéristiques moléculaires :

- Une des extrémités doit posséder une forte affinité avec la surface.
- Il doit être composé de chaînes alkyles ou d'un alignement de cycles aromatiques, qui jouent un rôle crucial dans l'alignement des molécules sur la surface.
- Enfin, il doit posséder une extrémité en position terminale permettant l'introduction de fonctions chimiques permettant, par exemple, l'immobilisation d'un motif sonde

L'assemblage de ces molécules se fait d'abord par l'extrémité possédant une forte affinité avec la surface. Puis, la présence d'une chaîne d'alkyle ou de cycles aromatiques permet l'organisation de la couche par la création de forces de répulsion de type Van der Waals entre chaînes (cf. figure 2.3).

FIGURE 2.3 – **Représentation idéale de la formation de mono-couche organique par auto-assemblage de SAM. [82]**



A partir de ce concept général, on peut noter trois types de SAM, jouant sur l'extrémité affine avec la surface : les organosilanes sur surfaces de silices, les alkanethiols et organosulfures sur surfaces d'or et ceux formés par hydrosilylation sur des surfaces à base de silices. [82]

SAM à base d'organosilane

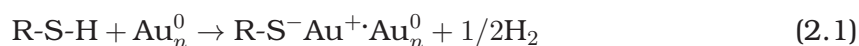
La formation de mono-couches auto-assemblées fondées sur la réaction d'organosilanes sur des surfaces de silice (SiO_2) ou possédant des groupements hydroxyles sont probablement les plus exploitées. L'intérêt réside dans la formation de SAM sur des surfaces de verres silylées. Ainsi, ces surfaces transparentes peuvent trouver notamment des applications en optique linéaire et non-linéaire, [83], mais également dans le domaine des capteurs. [84] Pour former ce type de mono-couche organique, les surfaces sont au préalable traitées et nettoyées dans le but d'obtenir le plus possible de groupements silanols / hydroxyles sur la surface. La surface est ensuite plongée dans une solution contenant un précurseur de types : alkyltrichloro-, alkyltriméthoxy-, ou encore alkyltriéthoxysilane qui réagissent spécifiquement avec les groupements hydroxyles de la surface.

Bien que le mécanisme de formation de la mono-couche soit encore en discussion (fonction de beaucoup de paramètres), la formation de mono-couches auto-assemblées selon cette approche reste simple à mettre en oeuvre. Néanmoins, il est difficile de les reproduire afin d'obtenir une mono-couche bien définie. [85, 86] Par ailleurs, cette surface présente des limitations du fait de la sensibilité particulière de la liaison Si-O. Ainsi, pour des surfaces métalliques ou encore d'oxydes semi-conducteurs cette méthodologie ne permet pas une modification efficace dans le cadre du travail que nous souhaitons effectuer.

SAM à base d'alkanethiol et d'organosulfure

Les composés organosulfurés, et en particulier, les alkanethiols sont en mesure de former des mono-couches organiques auto-assemblées. Celles-ci se forment spontanément sur des surfaces métalliques d'or, d'argent, de platine ou encore de cuivre. Généralement, l'or est utilisé en priorité, car il présente le moins d'oxyde dans les conditions de l'ambiant. Ainsi, sur l'or, les groupements

thiols sont chimisorbés sur le métal en formant une liaison thiolate/Au :



Ainsi, la surface est immergée dans une solution d'alkanethiols pour former en quelques minutes une mono-couche organique, qui va se réorganiser *via* des interactions interchaînes pour former une mono-couche organique auto-assemblée en quelques heures. [87] Il se forme alors, une mono-couche organique (épaisseur ≈ 20 Å) à la surface du métal dont l'agencement est principalement géré par les interactions de type Van der Waals entre les chaînes alkyles.

De plus, ces mono-couches sont stables dans une plage de potentiels comprise entre +1 V et -1 V par rapport à l'ECS, [88] et pour des températures inférieures à 100 °C. [89] Elles peuvent en outre être stable à l'air pendant une à deux semaines. Au-delà de cette période une oxydation des groupements thiols survient, conduisant à la formation de groupements sulfinates (SO_2) ou sulfonates (SO_3). [90] Cette stabilité réduite dans le temps est une limitation qui se fait particulièrement ressentir lorsqu'il est nécessaire d'effectuer plusieurs étapes de modifications chimiques après la formation de la mono-couche organique. Néanmoins, ce type de modification de surface reste très développé, du fait de sa simplicité de mise en oeuvre et autorisant des analyses SPR.

2.1.3 Modification de Surface par Electrogreffage - Electro-réduction des sels de diazoniums

Le terme électrogreffage, directement traduit de "electrografting", caractérise une réaction électrochimique qui permet de générer une couche organique sur une surface conductrice *via* une liaison covalente. [78] Le terme de chimisorption peut être également employé lorsque l'on parle de formation de liaisons covalentes à un métal. Il existe donc une différence entre une couche organique chimisorbée et une couche organique physisorbée (électropolymérisation par exemple). Toutefois, il peut être difficile de faire la différence entre les deux types de formations de couches organiques. Pour cela, on est obligé de s'aider de plusieurs techniques comme l'XPS (pour X-ray Photoelectron Spectroscopy), l'IR, l'AFM, ou l'électrochimie pour caractériser une couche organique liée à la surface *via* une liaison covalente, en particulier lorsque celle-ci

est de l'ordre de la mono-couche organique (on retrouve par exemple dans les travaux de Leroux *et al.* une épaisseur de couche mesurée par AFM de 0,65 nm [91]). On retrouve principalement deux grands types d'électrogreffage, ceux qui s'opèrent par voie oxydante et ceux qui sont réalisés par voie réductrice.

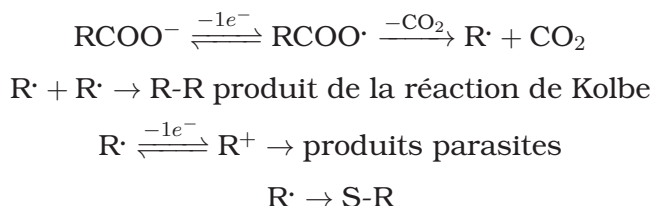
Electrogreffage par voie oxydante

Parmi les composés organiques utilisés dans les processus d'électrogreffage par voie oxydante, on retrouve principalement quatre séries de composés. Les amines représentent la première famille de ces composés organiques. Pour pouvoir former une liaison covalente suite à l'oxydation électrochimique d'une amine, seules des électrodes non oxydables sont utilisables. En effet, même s'il est possible d'utiliser des composés contenant des groupements permettant un transfert d'électrons intermoléculaires (abaissant ainsi le potentiel d'oxydation), [92] le potentiel d'oxydation en milieu protique ou aprotique se trouve généralement au-dessus de +0,7 V/ECS. L'électrogreffage par voie oxydante d'une amine s'effectue selon un mécanisme EC à un électron et à un proton, résumé dans le schéma réactionnel suivant (S correspondant à la surface) :

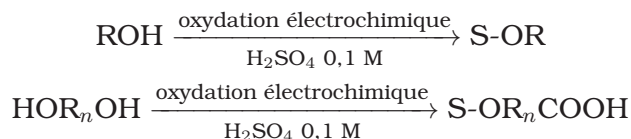


La deuxième famille de composés organiques pour cette voie oxydante est la famille des carboxylates. La formation de liaisons covalentes à partir de ces composés a été uniquement observée sur des électrodes de carbones et pour la première fois avec des benzènes d'acétates. [93] Le mécanisme de cette réaction suit le procédé des réactions de Kolbe. Tout d'abord, il y a déprotonation de l'acide acétique en sa base conjuguée. La base est oxydée pour donner un radical, par départ de CO₂, qui est utilisé pour former une liaison covalente avec la surface de l'électrode. Cette dernière étape, du fait de la similitude avec la réaction de Kolbe, pourra rentrer en compétition avec des réactions parasites (désirées dans la réaction de Kolbe). Nous pouvons donc résumer la réaction

selon le schéma suivant (avec S correspondant à la surface) :



La troisième famille de composés organiques pour cette voie oxydante est la famille des alcools. L'électrogreffage utilisant des alcools a principalement été utilisé pour des alcools possédant une chaîne alkyle [94] (potentiel d'oxydation de +1,85 V / (Ag|Ag⁺) sur électrode de carbone) et pour des alcanes diols [95] dans des milieux acides forts comme H₂SO₄ ou LiClO₄. Le mécanisme responsable de cet électrogreffage n'a jamais été démontré, mais peut être résumé selon le schéma réactionnel suivant (avec S correspondant à la surface) :



La quatrième et dernière famille de composés organiques que l'on peut utiliser pour l'électrogreffage par voie oxydante est la famille des réactifs de Grignard (RMgX). Cette réaction a uniquement été étudiée sur des surfaces de silice. Ces surfaces étant facilement oxydables, il est nécessaire de travailler sans aucune trace d'eau et d'oxygène, ce qui est un avantage pour les réactifs de Grignard, ces derniers étant eux même très sensibles à l'eau. [96] Cette technique permet alors de fonctionnaliser une surface par liaison covalente avec des groupements de types méthyles, alkyles, aryles, vinyles ou encore éthylnyles.

Electrogreffage par voie réductrice - Les sels d'aryldiazonium

A l'instar de la méthodologie oxydante précédente, il est possible de fonctionnaliser des surfaces par voie réductrice. Plusieurs composés organiques se prêtent facilement à ce processus et ils peuvent être regroupés en deux principales familles : les vinyliques et les sels d'aryldiazonium. Dans la suite nous traiterons uniquement la réduction des sels d'aryldiazonium.

Les sels de diazoniums aromatiques de type ArN_2^+X^- sont généralement connus pour leur aptitudes à former des colorants azoïques. L'une des approches les plus importantes, est la "dédiazotation" qui consiste en la perte du diazote pour former le radical Ar^\bullet pour la modification de surfaces par électro-greffage. La première mise en évidence de la réduction des sels d'aryldiazonium a été obtenue par Elfonso en 1958. Celui-ci avait mis clairement en avant la formation de l'aryl radical (processus à un électron) sur une électrode au mercure. [97]

La première chose que l'on peut retenir, sur les sels d'aryldiazonium, est leurs facilité d'obtention et leur stabilité. La voie habituelle de synthèse décrite dans la littérature consiste à mélanger à froid une amine aromatique avec du nitrite de sodium en milieu acide puis de filtrer et de rincer le précipité obtenu. La synthèse peut être également réalisée en milieu organique en remplaçant le nitrite de sodium par du nitrite de *tert*-butyle. [78] Le sel d'aryldiazonium peut également être formé *in situ* à partir de l'amine correspondante. Le sel d'aryldiazonium ainsi formé est directement utilisé dans la cellule électrochimique pour former l'aryl radical. [98] Plus récemment, il a également pu être démontré que l'on pouvait partir de la fonction précurseur d'une amine c'est-à-dire la fonction nitro. Pour cela, on enregistre la voltampérométrie cyclique d'un composé de type ArNO_2 en milieu acide contenant du nitrite de sodium. La fonction nitro est réduite en amine selon un processus électrochimique à six électrons et six protons, puis est directement transformée en sel d'aryldiazonium *via* le nitrite de sodium. A partir de là, le sel d'aryldiazonium est réduit pour obtenir le radical Ar^\bullet . Il a été remarqué lors de cette réaction que l'ensemble de la chaîne réactionnelle a lieu dans une unique vague de réduction irréversible. [99] Ces deux derniers procédés sont surtout intéressants pour des composés dont la synthèse est délicate particulièrement due à l'instabilité du sel d'aryldiazonium. De plus, les sels d'aryldiazonium sont stables en milieu acide, mais leur stabilité diminue avec l'augmentation du pH ($\text{pH} > 2-3$). [100] A pH neutre et basique ils peuvent donner lieu à la formation d'hydrazones et la base respective (Ar-N=N-OH et Ar-N=N-O^-). Nous pouvons noter enfin qu'il existe un grand nombre de sels d'aryldiazoniums commerciaux présentant différentes fonctions en position *para* du diazonium.

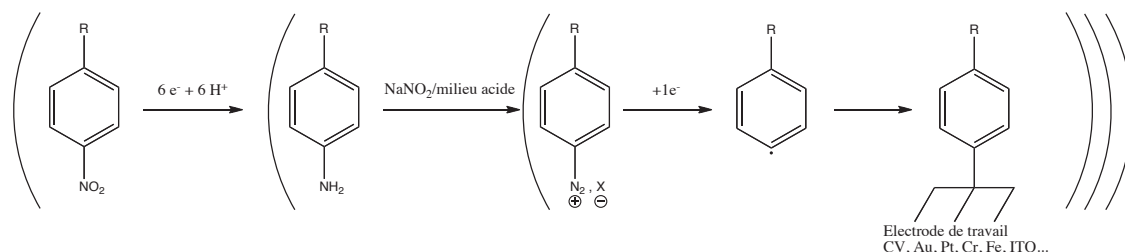
La première mise en évidence de la formation d'une couche organique com-

pacte suite à la réduction d'un sel d'aryldiazonium a été montrée par un effet bloquant de l'électrode. [101] En effet, suite à la modification de l'électrode par une couche organique selon ce procédé, l'électrode se passive. Il devient alors difficile de faire passer des électrons de l'électrode de travail à la solution. Par la suite, afin de montrer l'efficacité de ce genre de modifications, des tests ont permis de mettre en avant la robustesse de la couche organique. Il a été montré que les surfaces résistent à des lavages aux ultrasons et cela dans différents types de solvants, ou encore aux hautes températures, balayant ainsi l'hypothèse d'une simple adsorption du substrat sur l'électrode. Le cas le plus étudié est celui du sel d'aryldiazonium issu du 4-nitrobenzene. Pour ce composé, il a en effet été prouvé par voltampérométrie cyclique que la couche organique répondait toujours de la même façon après les différents lavages aux ultrasons (15 min dans l'acétonitrile, DMF, DMSO, benzène, benzonitrile, acétone, éthanol, méthanol, dichlorométhane et chloroforme). [102] Des analyses par gravimétrie thermique et par XPS ont permis de montrer que la couche de 4-nitrophényle reste stable autour de 200 °C et que sa dégradation a lieu entre 300 et 500 °C. [103] Il a même été démontré, par XPS, que la couche organique pouvait résister à l'application de forts potentiels électrochimiques (+1,8 V/ECS et -2 V/ECS). [104] Il a également été montré que cette modification de surface pouvait avoir lieu sur une grande quantité de supports conducteurs ou semi-conducteurs (C, Au, Pt, Zn, ITO, Fe, Cr, Si, etc...). [105] Actuellement, les discussions se tournent principalement autour de la formation de mono ou de multi-couches organiques. En effet, le principal défaut de cette méthodologie est le contrôle de l'épaisseur de la couche organique. Il a pu être montré que les radicaux formés pouvaient se coupler aux groupements aryls présents sur la surface, formant ainsi des multi-couches. La principale solution pour contrebalancer cette réaction est d'ajouter un groupement "encombrant" en position *para* par rapport au diazonium. [91] L'encombrement de la surface permet alors de protéger la surface des radicaux formés en solution, et d'obtenir alors une mono-couche organique.

Suite à cet ensemble de données, on peut résumer l'électrogreffage par réduction des sels d'aryldiazonium selon le schéma réactionnel présenté dans la figure 2.4.

Comme on a pu le voir sur plusieurs aspects, la modification de surface par

FIGURE 2.4 – **Schéma général d'électrogreffage issu de la réduction d'un sel d'aryldiazonium de type $R-Ar-N_2^+$ ou provenant de précurseurs de types $R-Ar-NH_2$ ou $R-Ar-NO_2$, où R représente un ensemble de fonctions diverses positionnées en position para du diazonium**



la réduction de sels de diazoniums présente un grand nombre d'intérêts. Nous allons donc à présent orienter ce travail vers l'obtention de couches organiques permettant l'immobilisation de l'ADN.

2.2 Modification de surface *via* la réduction de sel de diazonium pour l'obtention de couche organique *para*-benzene chlorure de sulfonyl ($Ar-SO_2Cl$)

Dans le cadre de notre travail, l'objectif principal est donc de former une couche organique à la surface d'une électrode possédant une fonction d'ancrage spécifique de l'ADN simple ou double brin. Pour ce faire nous étudierons la formation de la couche organique sur une électrode de carbone, d'or ou encore sur des surfaces de chrome. En effet, la modification de la surface devra être envisagée sur différents types de supports pour permettre l'emploi de différentes techniques (QCM et AFM en particulier).

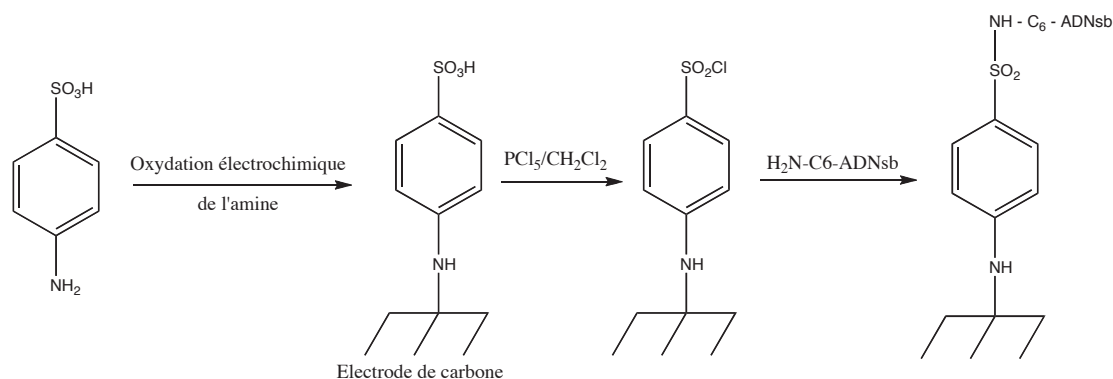
De plus, la couche organique ainsi formée devra posséder une faible rugosité et une faible épaisseur (et donc une faible masse sur la surface). En effet, pour l'emploi de techniques de champs proches comme l'AFM, et tout particulièrement dans le cas de la visualisation de complexes ADN/Protéines (tailles inférieures à 10 nm) il est nécessaire de posséder une très faible rugosité pour pouvoir l'envisager. De plus, la surface devra recouvrir de façon homogène la

surface tout en ayant une faible épaisseur de couche. Ces paramètres seront principalement importants dans le cas des études cinétiques par QCM. En effet, la QCM et notamment l'application de la loi de Sauerbrey ne peut être appliquée que pour des masses totales sur la surface inférieure à 3-4 μg pour un cristal de quartz de type AT-Au (3% de la fréquence de vibration, ici 9 MHz, et $1,026 \cdot \Delta f = \Delta m$).

Enfin, la couche organique déposée sur la surface devra posséder une fonction d'ancrage de l'ADN, idéalement non modifiée en extrémité. Pour ce faire, nous nous baserons sur les travaux précédemment effectués au sein du laboratoire. Ces derniers ont pu mettre en avant la possibilité de fixer un ADN simple brin modifié en extrémité, par une amine sur une fonction de type $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. Ainsi, l'amine située en extrémité de l'ADNsb modifié se fixe à la surface suite à la substitution nucléophile du chlore de la fonction $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. Cette fonction était introduite sur la surface par l'intermédiaire d'un polymère conducteur de type poly-thiophène. [53, 51, 106] Néanmoins, cette technique de modification de surface présente le désavantage de former des couches organiques sur une surface avec une forte épaisseur (et très proche de la limitation de l'équation de Sauerbrey) et comportant généralement de fortes rugosités (incompatibles avec l'AFM). On peut également retrouver dans la littérature l'utilisation de la fonction $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ pour l'accroche d'ADNsb modifié en extrémité par une amine. [107, 108] L'un de ces cas, le plus intéressant pour nos travaux, est représenté dans la figure 2.5. En effet, les auteurs sont partis de l'acide sulfanilique et ont opéré la modification d'une surface de carbone par électrogreffage *via* l'oxydation de l'amine de l'acide du 4-aminobenzène-sulfonique (ou acide sulfanilique) selon la procédure décrite dans la section 2.1.3 (potentiel d'oxydation appliqué d'environ + 1 V/(Ag|Ag⁺)). La surface est alors modifiée par une couche organique de type $\text{NH-Ar-SO}_3\text{H}$, à laquelle les auteurs ont appliqué une solution de PCl_5 / CH_2Cl_2 pour obtenir une couche organique de type $\text{NH-Ar-SO}_2\text{Cl}$. Une fois la surface activée, l'ADNsb modifié par une amine en extrémité est additionné sur la fonction $-\text{SO}_2\text{Cl}$. La surface ainsi modifiée a été utilisée par la suite pour la détection d'ADNsb spécifique à la séquence, accrochée à la surface, par voltampérométrie cyclique et par impédance électrochimique.

Comme il a pu être vu dans la section 2.1.3, l'électrogreffage par oxydation

FIGURE 2.5 – **Modification de surface de carbone par une fonction NH-Ar-SO₃H, activation de la couche organique par PCl₅ pour l'obtention de la fonction NH-Ar-SO₂Cl permettant l'accroche d'un ADNsb modifié en extrémité par une fonction amine d'après Chen et al. [108]**



d'une amine nécessite un fort potentiel électrochimique en milieu protique. Ceci peut s'avérer limitant sur des surfaces comme l'or. En effet, on remarque que le potentiel d'oxydation de l'or en milieu protique se trouve aux environs de + 0,9 V / ECS (potentiel inférieur à l'oxydation de l'amine). A l'heure actuelle, selon la littérature, seules les modifications par les SAM ou par la réduction de sel d'aryldiazonium semblent adaptées pour l'obtention de systèmes mono-couches organiques. Si nous reprenons notre fonction d'ancrage Ar-SO₂Cl, dans le cas où nous utiliserions les SAM, nous devrions alors passer par un composé organique de type HS-R-Ar-SO₂Cl / SO₃H (où R est une chaîne alkyle). Et dans le cas où nous utiliserions les sels d'aryldiazoniums, nous devrions alors partir d'un composé organique de type X⁻N₂⁺-Ar-SO₂Cl / SO₃H. Le principal problème dans le cas des SAM est qu'il n'existe pas de produits commerciaux permettant d'obtenir rapidement ce genre de composés. De plus, ce genre de modification de surface est principalement adapté aux surfaces d'or. En revanche, il existe des composés organiques commerciaux comportant les fonctions adéquates pour former le(s) composé(s) de type X⁻N₂⁺-Ar-SO₂Cl / SO₃H et qui présentent l'avantage de pouvoir modifier différents types de surfaces conductrices. Le premier produit est le para-nitrobenzène chlorure de sulfonyle (O₂N-Ar-SO₂Cl). Ce composé présente l'avantage de posséder la fonction d'ancrage souhaitée, la fonction nitro pouvant par ailleurs être pré-

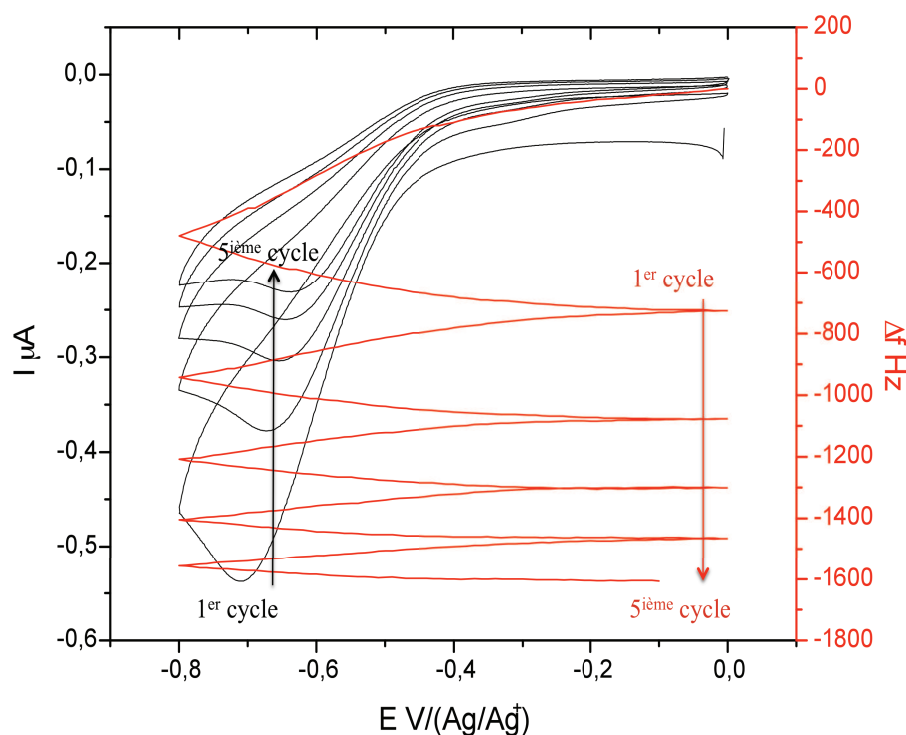
curseur d'un sel d'aryldiazonium, comme il a pu être vu dans la section 2.1.3. Le deuxième composé est l'acide sulfanilique ($\text{H}_2\text{N-Ar-SO}_3\text{H}$) qui possède deux fonctions précurseurs : l'amine qui permet d'obtenir *in situ*/ou non le sel de diazonium et la fonction SO_3H qui peut être une forme précurseur de SO_2Cl (on peut passer de SO_3H à SO_2Cl par une réaction de chlorination *via* des composés tels que PCl_5 ou SO_2Cl_2).

2.2.1 Modification d'une surface par la réduction du sel de diazonium généré *in situ* à partir de la fonction nitro du composé para-nitrobenzène chlorure de sulfonyle

Formation d'une couche organique constituée de la fonction $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ à la surface d'un cristal de quartz d'or

Pour pouvoir directement tester notre surface pour l'accroche de l'ADNsb / db, nous avons opéré sur un cristal de quartz d'or. Nous avons ainsi enregistré la prise de masse au cours de la formation de la couche organique *via* la réduction de la fonction nitro. Pour pouvoir réduire un sel de diazonium formé *in situ* à partir d'une fonction nitro, nous avons additionné, dans 5 mL de CH_3CN 5 mM, du chlorure de sulfonyle de *para*-nitrobenzène et une pré-solution de 200 μL d' HCl 1M contenant trois équivalents de NaNO_2 par rapport au réactif. La présence du milieu acide permet la réduction électrochimique de la fonction nitro en fonction amine puis le NaNO_2 en milieu acide permet de passer de la fonction amine en sel d'aryldiazonium. Le sel d'aryldiazonium sera alors réduit électrochimiquement à la surface de l'électrode suivant un mécanisme à un électron. On enregistre alors en parallèle la voltampérométrie cyclique et la variation de la fréquence à la surface du cristal de quartz d'or (figure 2.6). On peut voir dans la figure 2.6 que, lors du premier voltampérogramme cyclique (de + 0 V à - 0,8 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$)), on enregistre un pic de réduction à -0,7 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$) caractéristique de la réduction des fonctions nitro en milieu aqueux sur une électrode d'or. Les voltampérogrammes cycliques suivants possèdent un pic de réduction diminuant en intensité avec le nombre de cycles. On constate également un décalage du potentiel électrochimique du pic de réduction vers des potentiels moins négatifs avec le nombre de cycles (de -0,7 V à -0,65 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$)). En parallèle, on peut observer que les pics de réduction sont associés à une diminution de la fréquence du cristal de quartz et donc assimilables

FIGURE 2.6 – **Voltampérométrie cyclique et suivi par QCM d'un cristal de quartz d'or lors de l'application d'un potentiel électrochimique compris entre + 0 V et - 0,8 V sur une solution de para-benzene chlorure de sulfonyle (5mM) en présence de NaNO_2 (3 équivalents) dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1 M de Bu_4NPF_6 (servant de sel support) et 200 μL d' HCl 1M. Potentiel enregistré par rapport à une électrode $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ (0,1 M) avec une vitesse de balayage de 100 mV/s**



à une prise de masse ($\Delta f_{\text{final}} = -1600\text{Hz} \approx 1,6\mu\text{g}$) d'après la loi de Sauerbrey (dans le cas où on considère que les molécules additionnées sont assimilables à de petites sphères rigides). On constate également que la variation de la fréquence pour chaque cycle est proportionnelle à l'intensité du pic de réduction respectif. Cet effet commun nous laisse à penser que la prise de masse et donc la modification de la surface est concomitante à la réduction des groupements nitro du *para*-benzene chlorure de sulfonyle. Il est à remarquer que dans le cas où le NaNO_2 n'est pas présent en solution, le pic de réduction reste constant au cours de l'application des différents voltampérogrammes cycliques, ce qui conduit à penser à l'existence d'un autre mécanisme que l'unique réduction

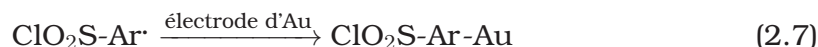
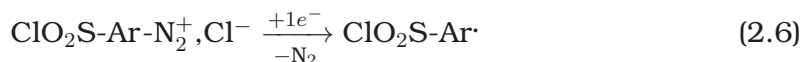
des groupements nitro.

Ainsi à partir du mécanisme de la réduction des groupements nitro puis de la présence des différents constituants de la solution, on pourra envisager un mécanisme, quant à la modification de la surface. On sait que les groupements nitro se réduisent selon un mécanisme à six protons et six électrons pour donner une fonction amine par l'intermédiaire d'un système à quatre protons et quatre électrons, donnant une hydroxylamine :



Dans notre milieu, nous avons ajouté au préalable 3 équivalents de NaNO_2 par rapport au réactif de départ. Dans ce cas de figure, on peut supposer que l'amine formée peut rapidement générer un sel de diazonium à la surface de l'électrode et être ainsi directement réduit en aryl radical, ce qui pourrait alors expliquer la prise de masse enregistrée par le cristal de quartz. De plus, parallèlement à la prise de masse sur la surface du cristal de quartz, on enregistre une diminution de l'intensité du courant. Or, l'intensité du courant est directement reliée à la quantité de matière réduite à la surface, mais également à la résistance au transfert électronique entre l'électrode de travail et la solution. Dans le cas de l'électrogreffage par la réduction des sels d'aryldiazonium, le principal critère démontrant la fonctionnalisation de la surface est la passivation de l'électrode. Cette passivation entraîne une forte diminution de l'intensité du courant. Le faible décalage du potentiel de pic de - 0,7 V à - 0,65 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$) est probablement due à une chute ohmique liée au changement d'état de la surface de l'électrode. L'effet commun de la prise de masse et la passivation progressive de l'électrode nous encourage alors à supposer que dans la vague de réduction à - 0,7 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$), on observe non seulement la réduction des groupements nitro, mais également la réduction du sel d'aryldiazonium formé suite à la réaction entre l'amine et le NaNO_2 . On peut alors résumer le schéma réactionnel s'opérant à - 0,7 V / ($\text{Ag}|\text{Ag}^+$) à la surface du

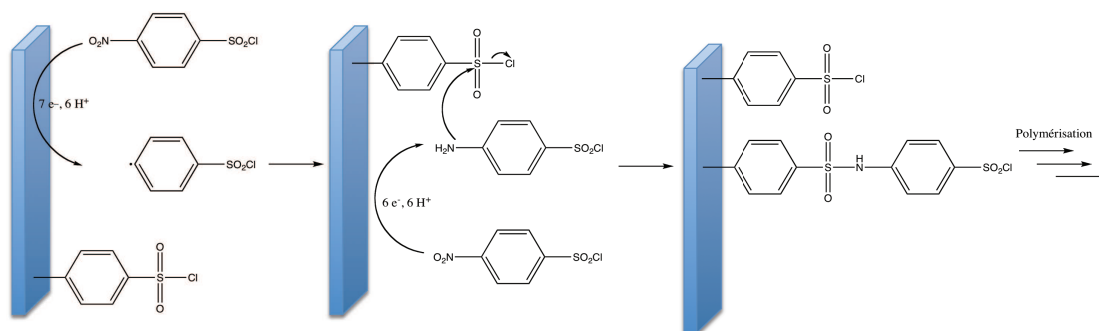
cristal de quartz d'or de la façon suivante :



On retrouve donc un mécanisme final à sept électrons et six protons permettant de décrire la fonctionnalisation de surface en partant d'un groupement nitro. On peut néanmoins supposer que la modification de la surface ne s'effectue pas de façon homogène. En effet, on retrouve dans la littérature que la passivation de l'électrode doit être quasiment complète à la fin du premier cycle. Et que la masse enregistrée sur cristal de quartz arrête de croître à la fin du premier cycle. [109] Or, nous pouvons ici remarquer d'une part que le courant ne disparaît pas complètement, et cela même après 5 cycles, et d'autre part que la masse continue de croître. On peut supposer que ce phénomène est directement dû à la molécule organique utilisée et aux mécanismes régissant la réaction. En effet, lors de la réduction électrochimique des groupements nitro, on forme un intermédiaire de type amine. Or, le chlore du chlorure de benzènesulfonyl est un très bon nucléofuge, qui réagit très rapidement avec toutes espèces nucléophiles. On peut donc supposer que la formation de multicouches organiques fait suite à la réaction de l'intermédiaire réactionnel sur la fonction d'ancrage. Cela, implique qu'une partie des molécules réduites à la surface servent à modifier la surface et une autre partie s'arrête au niveau de l'amine pour réagir avec les fonctions présentes sur la surface (cf. schéma 2.7).

Cependant, même si la surface modifiée ne présente pas une homogénéité parfaite, celle-ci présente tout de même la fonction d'ancrage $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ en extrémité de chaîne. La présence de cette fonction peut alors nous permettre de valider le concept de l'accroche de l'ADNsb par ce biais. Elle peut également valider la possibilité de faire réagir cet ADNsb avec une protéine telle que Hs-Rad51. La validation du concept se fera *via* la microbalance à cristal de quartz pour l'accroche de l'ADNsb et *via* la microscopie à force atomique pour la visualisation de complexes ADNsb / Protéines.

FIGURE 2.7 – **Mécanisme schématisé de la fonctionnalisation d'une électrode de travail lors de la réduction du groupement nitro en présence de NaNO_2 / HCl dans le cas du composé organique para-nitrobenzène chlorure de sulfonyle**

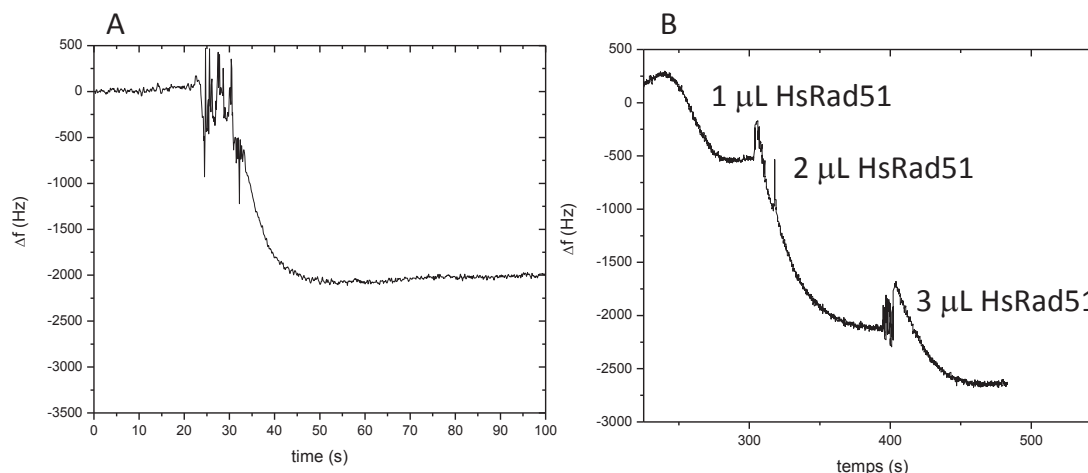


Application de la modification de surface par une fonction de type $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ pour l'accroche de l'ADN et la visualisation de complexes ADNsb / Protéines par AFM

Comme on a pu le voir, afin de valider le concept et les objectifs expérimentaux, la surface créée quoi qu'imparfaite, a été utilisée comme support de l'ADNsb. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps, fait réagir avec la surface du cristal de quartz une solution d'ADN simple brin (ADNsb) d'environ 1600 acides nucléiques. Celui-ci a été produit par PCR asymétrique et ne possède alors pas de modifications en extrémité. Nous avons alors enregistré la variation de la fréquence du cristal de quartz d'or suite à l'injection d'une solution de cet ADNsb.

Dans la figure 2.8-A nous pouvons ainsi voir que suite à l'injection de 20 μL d'ADNsb, nous avons une forte diminution de la variation de la fréquence et donc une forte augmentation de la masse à la surface du cristal de quartz ($\Delta f \approx 2000\text{Hz}$). Dans le cas de l'accroche de l'ADNsb, nous n'appliquerons pas l'équation de Sauerbrey à la variation de la fréquence pour obtenir la masse de produits accrochés. En effet, comme indiqué précédemment l'équation de Sauerbrey ne peut être appliquée que lorsque les espèces additionnées à la surface sont assimilables à de petites sphères rigides ce qui n'est pas le cas pour de longues séquences d'ADNsb / db. Cette diminution de la variation

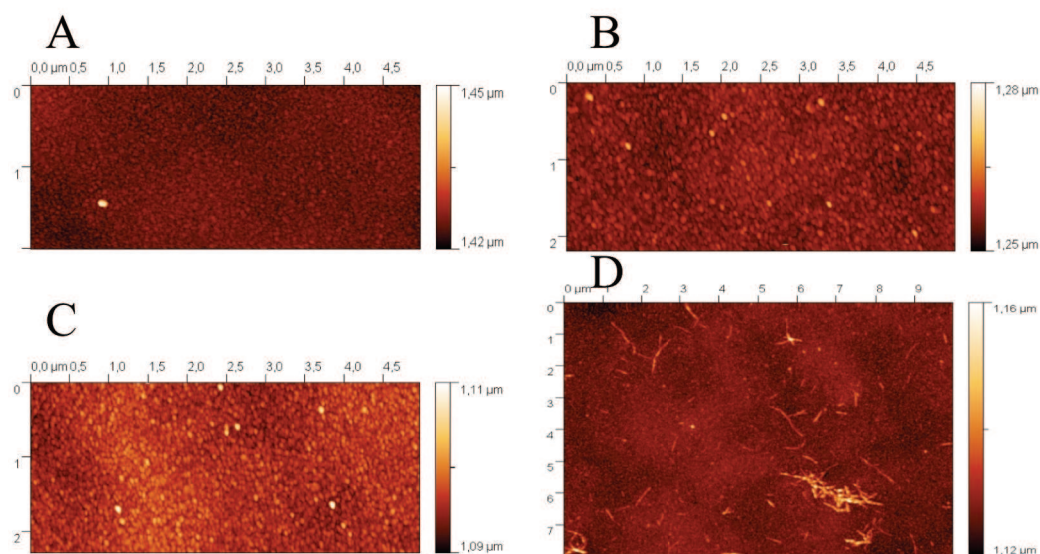
FIGURE 2.8 – **Suivi de la variation de fréquence d'un cristal de quartz d'or modifié par la couche organique Ar-SO₂Cl par la QCM, lors de : A, l'ajout de 20 μ L d'ADNsb (1600 acides nucléiques) produit par PCR asymétrique ; B, de l'ajout successif de 1, 2 et 3 μ L d'une solution de HsRad51 à 130 μ M**



de la fréquence peut être attribuée à l'accroche de l'ADNsb sur la surface. A cette surface, nous avons additionnée par la suite plusieurs quantités (1, 2 et 3 μ L) d'une solution de HsRad51 de concentration 130 μ M dans un tampon phosphate à pH 7,4 (0,1 M en phosphate, 50 mM NaCl et 5 mM Mg²⁺). On enregistre alors une diminution de la variation de la fréquence suite à l'injection de chaque quantité de protéine. Cette diminution de la fréquence est proportionnelle à la quantité injectée sauf pour 3 μ L, ce qui nous permet de supposer que nous arrivons à saturation. Même si on ne discute pas du mécanisme, le fait que la variation de la fréquence diminue suite à l'injection de la protéine, indique que la prise de masse supplémentaire est vraisemblablement due à l'interaction ADNsb / Protéine. De plus, lorsque la protéine est injectée sur une surface uniquement modifiée par Ar-SO₂Cl, on n'observe pas de variation de la fréquence. Ceci implique qu'elle ne réagit pas avec la surface, donc la variation enregistrée dans la figure 2.8-B correspond bien à l'interaction de la protéine avec l'ADNsb. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé la même modification de surface sur une plaque d'or possédant une

rugosité d'environ 1,2 - 1,5 nm. A cette surface modifiée par ArSO_2Cl selon la procédure précédente, on fait réagir de l'ADNsb dans un tampon phosphate, la surface est ensuite rincée. Puis dans le tampon de réaction (600 μL) nous injectons 6 μL d'une solution de HsRad51 à une concentration de 130 μM . Après rinçage, la surface est visualisée entre chaque étape par AFM en mode non-contact.

FIGURE 2.9 – **Visualisation par AFM en mode non-contact d'une surface d'or A : sans modifications, B : suite à la modification de la surface par ArSO_2Cl lors de la réduction du sel de diazonium correspondant formé *in situ* à partir d'une fonction nitro, C : de la même surface après ajout de l'ADNsb de 1600 bases, D : après l'ajout de 6 μL de HsRad51 à une concentration initiale de 130 μM dans 600 μL de tampon phosphate pH 7,4**



Ainsi, dans la figure 2.9-A et -B, on obtient une rugosité de base pour la surface d'or d'environ 1,3 nm. Après modification par réduction du sel d'aryl-diazonium formé *in situ* à partir d'une fonction nitro, on obtient une rugosité de 1,43 nm. On peut noter que dans la figure 2.9-C, qu'après ajout de l'ADNsb nous observons très peu de changements au niveau de la surface comparée à l'image obtenue figure 2.9-B. En revanche, après ajout de la protéine HsRad51, qui doit former un filament protéique autour de l'ADNsb, on note dans la figure

2.9-D l'apparition d'objets sur la surface d'or assimilables à de longs filaments. Cette série d'images nous laisse à penser que l'ADNsb est bien fixé de façon covalente à la surface. Cependant, on ne peut visualiser l'ADNsb du fait que la rugosité de la surface est supérieure à la taille même de l'ADNsb (environ de 1,5 nm mesuré par AFM pour un ADNdb). De plus, lorsque l'on effectue un zoom sur une partie des filaments observés possèdent bien une forme hélicoïdale. Cette forme particulière laisse supposer que la protéine a eu la possibilité de s'enrouler autour de l'ADNsb. Ces derniers ne sont envisageable que dans le cas où la protéine a accès à de l'ADNsb libre en solution et non adsorbé à la surface. Comme on opère un rinçage entre chaque étape, on peut donc bien supposer que l'ADNsb s'est immobilisé de façon covalente par une extrémité. Le dernier point que l'on peut noter est la répartition des complexes sur la surface. En effet, on peut voir dans la figure 2.9-D que les filaments protéiques se rassemblent principalement sur certaines zones de la surface. Ceci nous laisse penser que la formation de la couche organique sur la surface d'or ne s'effectue pas de façon homogène, comme nous le pensions d'après les résultats obtenus par la voltampérométrie cyclique et par la variation de la fréquence enregistrée dans la figure 2.6.

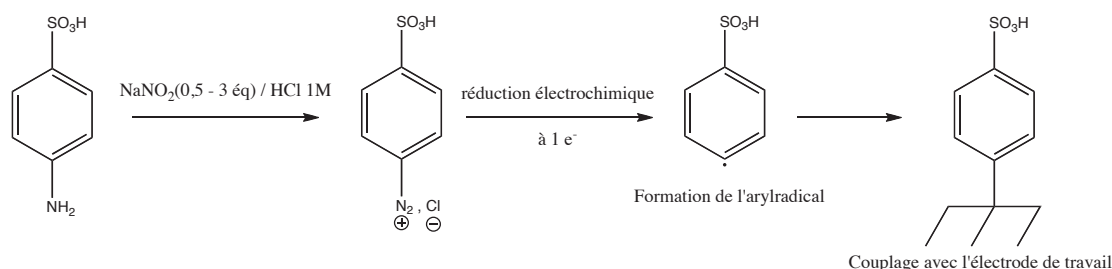
Ces différents résultats nous ont permis de démontrer la faisabilité globale du procédé pour mesurer l'interaction entre une protéine et l'ADNsb. Seulement, la procédure de modification de surface par la réduction d'un sel de diazonium formé *in situ* à partir d'une fonction nitro (dans le cas de ce composé) ne permet pas d'obtenir une couche organique homogène et probablement pas de l'ordre de la mono-couche organique. Pour pallier ce problème, nous nous sommes orienté vers la modification de surface *via* la réduction de sel de diazonium formé *in situ* à partir d'une fonction amine provenant de l'acide sulfanilique, où la fonction SO_2Cl est "protégée" des réactions de couplages par son précurseur SO_3H .

2.2.2 Réduction du sel d'aryldiazonium générés *in situ* à partir du groupement amino de l'acide sulfanilique sur différents substrats conducteurs

Il a été préalablement mis en évidence que, face à l'instabilité des sels d'aryldiazonium, il était envisageable de les réduire en les générant directement dans la cellule électrochimique. [78, 110] Pour cela, on opère à partir de l'amine

correspondante en présence du nitrite de sodium dans un milieu acide (dans notre cas HCl 1M). Le sel d'aryldiazonium ainsi formé *in situ* peut aussitôt être réduit au niveau de l'électrode pour former la couche organique correspondante. Nous avons donc étudié par voltampérométrie cyclique la réduction du sel d'aryldiazonium formé *in situ* à partir de l'acide sulfanilique en fonction de la concentration en nitrite de sodium sur électrode de carbone, puis sur électrode d'or (cf. figure 2.10). L'étude sur électrode de carbone servira de base pour démontrer le concept de la modification de l'électrode et son étude par voie électrochimique. L'étude sur l'or a pour but de spécifier les conditions de synthèse optimales afin de les reporter sur d'autres surfaces d'or utilisées lors des études par microbalance à cristal de quartz et par AFM. Enfin, pour démontrer la formation mono-couche organique unique formée à la surface par cette voie, nous utiliserons une surface de chrome possédant une très faible rugosité (rms \approx 0,2 nm).

FIGURE 2.10 – **Principe de la fonctionnalisation d'une électrode par la réduction du sel de diazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique**

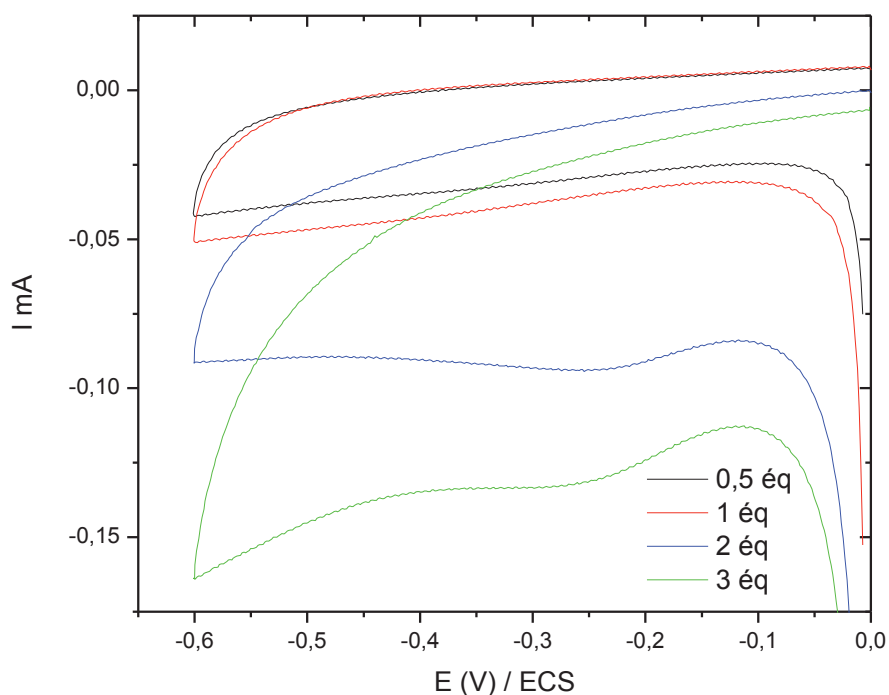


Modification électrochimique sur électrode de carbone par réduction de sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique

Dans un premier temps, nous avons étudié la réduction du sel de diazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique par voltampérométrie cyclique en fonction du nombre d'équivalents en NaNO_2 sur électrode de carbone dont le mécanisme décrit par la littérature est représenté dans la figure 2.10. L'acide sulfanilique (5mM) est additionné à différents équivalents de NaNO_2

(0,5-3 éq) dans HCl 1M. La voltampérométrie cyclique est enregistrée entre 0 et - 0,6 V / ECS avec une vitesse de balayage de 100 mV/s (figure 2.11).

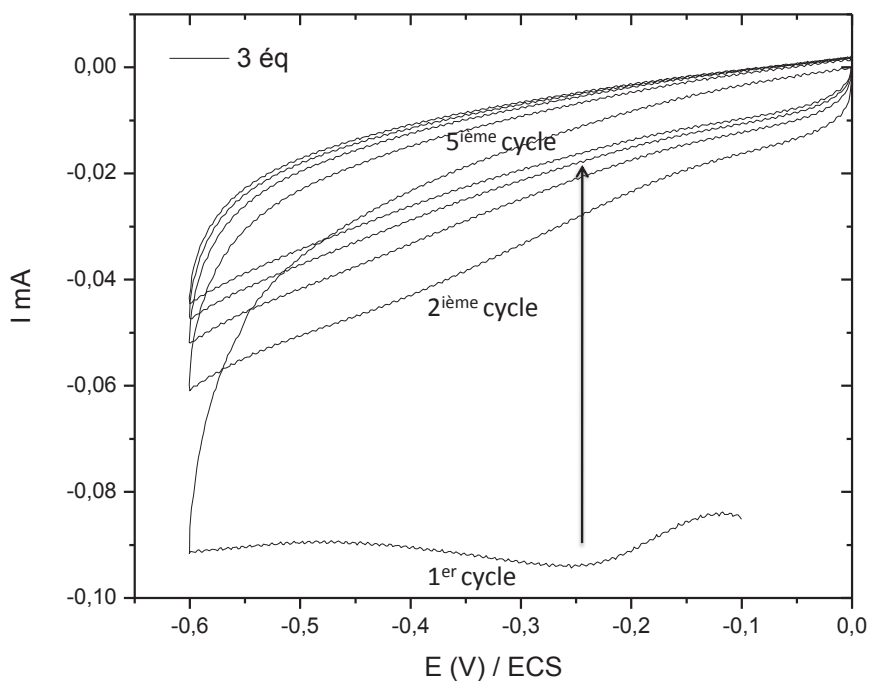
FIGURE 2.11 – **Voltampérométrie cyclique du sel de diazonium formé *in situ* sur une électrode de carbone à partir d'une solution d'acide sulfanilique (5mM) dans HCl 1 M et en fonction de différents équivalents de NaNO₂ (0,5-3éq). Les solutions sont préalablement mélangées pendant 10 minutes. La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 100mV/s.**



Nous observons que la voltampérométrie cyclique décrit un unique pic de réduction irréversible ($E \approx -0,25\text{V}/\text{ECS}$), caractéristique de la réduction mono-électronique des sels d'aryldiazoniums. Nous remarquons également que l'intensité du pic de réduction augmente avec la quantité d'équivalent en NaNO_2 par rapport à l'acide sulfanilique introduit. Ce fait correspond bien à la production du sel d'aryldiazonium généré *in situ*. Nous pouvons donc confirmer que le processus de réduction est bien défini pour deux équivalents en NaNO_2 . Nous travaillerons donc avec cette quantité de NaNO_2 dans la suite de la démonstration, sur électrode de carbone. Compte-tenu de cela, nous enregistrons le

voltampérogamme cyclique pour une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl (1 M) en présence de 2 équivalents en NaNO_2 pendant 5 cycles avec une vitesse de balayage de 100 mV/s (figure 2.12).

FIGURE 2.12 – Superposition de 5 cycles durant la voltampérométrie cyclique obtenue sur une électrode de carbone et dans une solution d'acide sulfanilique (5mM) en présence de 2 équivalents de NaNO_2 dans HCl 1M. La solution est préalablement mélangée pendant 10 minutes. La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 100mV/s.



Durant le premier cycle, on observe un signal cathodique correspondant à la réduction du sel d'aryldiazonium formé par la réaction entre l'amine et le NaNO_2 . Ce pic de réduction ($E \approx -0,25\text{V}/\text{ECS}$) tend à disparaître au cours des différents cycles suivants, caractérisant une passivation de l'électrode. Cette passivation de l'électrode correspond à la formation d'une couche organique compacte sur la surface de l'électrode. Cette modification s'opère par le couplage de l'aryle radical avec le carbone de l'électrode (formation d'une liaison covalente de type C-C). [78] De plus, nous pouvons remarquer que, dès le pre-

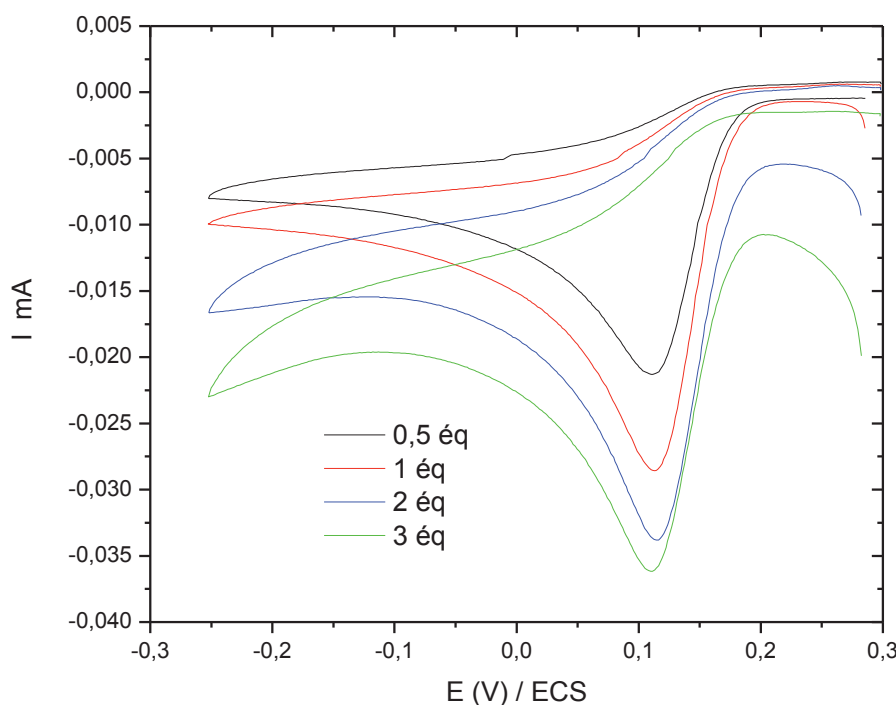
mier cycle terminé, l'intensité du courant de réduction tend à s'annuler complètement, ce qui peut nous laisser penser que le recouvrement de la surface est d'une part homogène et d'autre part qu'il s'étend sur toute la surface de l'électrode. Cette modification de surface *via* le sel d'aryldiazonium de l'acide sulfanilique est plus efficace que dans le cas de la réduction des groupements nitro étudiée dans la section précédente (section 2.2.1).

Modification électrochimique sur électrode d'or et sur une surface de chrome par réduction de sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique

De la même façon que pour l'électrode de carbone, nous avons, dans un premier temps, enregistré les voltampérogrammes cycliques d'une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl (1 M), en présence de différents équivalents de NaNO₂ (cf. figure 2.13).

Contrairement à l'électrode de carbone, la réduction du sel de diazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique présente pour l'ensemble des équivalents, un pic de réduction irréversible mieux défini et plus affiné ($E \approx +0,1V/ECS$). Ce type de voltampérogramme cyclique est caractéristique de la réduction de sel d'aryldiazonium généré sur électrode d'or. De plus, l'augmentation de l'intensité du pic de réduction avec l'augmentation du nombre d'équivalents en NaNO₂ montre bien la réduction du sel d'aryldiazonium. De plus, la quantité formée de ce sel augmente avec NaNO₂. On peut également remarquer que, pour plus de 1 équivalent (2 et 3 équivalents), la quantité de courant (ΔQ) sous le pic est quasiment identique. Il est également possible de remarquer que le pic s'élargit et se décale légèrement vers des potentiels plus cathodiques. Cette propriété est caractéristique de la réduction de sel d'aryldiazonium formé *in situ* (telle que la para-amino aniline) puis réduit sur une électrode d'or. [110] Ce phénomène a pu être corrélé avec une fonctionnalisation de surface moins performante. Cela montre également que la réduction de ce sel d'aryldiazonium généré *in situ* sur électrode d'or ne nécessite pas d'avoir plus d'un équivalent en NaNO₂ par rapport à l'acide sulfanilique. Ainsi, pour l'ensemble des études suivantes, nous utiliserons uniquement 1 équivalent de NaNO₂. Par la suite, nous enregistrons la voltampérométrie cyclique d'une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl (1 M) en présence de 1 équivalent en NaNO₂ pendant cinq cycles sur une électrode d'or (cf. figure 2.14).

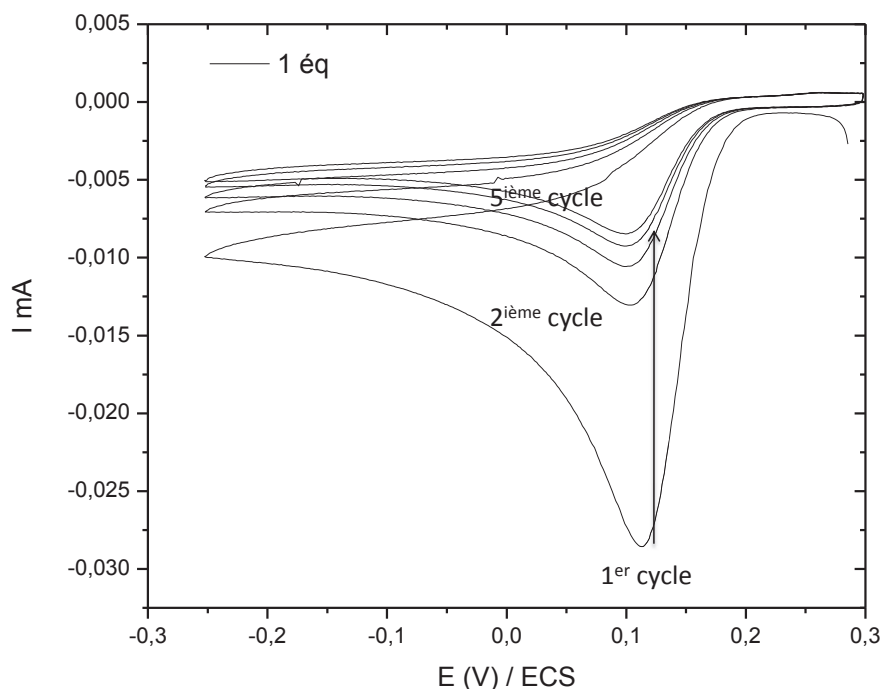
FIGURE 2.13 – **Voltampérométrie cyclique obtenue sur électrode d'or dans une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl 1 M et en fonction du nombre d'équivalents en NaNO_2 (0,5 - 3 éq). La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 100 mV/s.**



La figure 2.14 enregistrée sur électrode d'or présente de façon équivalente à l'électrode de carbone, un premier pic de réduction lors du premier balayage en potentiel qui tend à diminuer avec le nombre de cycles. Cependant, on peut remarquer que la diminution de l'intensité est moins importante que dans le cas de l'électrode de carbone. Nous pouvons alors supposer que, sur ce type d'électrode d'or, le phénomène d'électrogreffage est moins efficace, comme nous pouvons le supposer dans la figure 2.13. L'électrode servant principalement à déterminer le nombre d'équivalents en NaNO_2 nécessaire pour obtenir une réduction efficace du sel d'aryldiazonium, nous serons en mesure de rendre compte de cette modification sur un cristal de quartz d'or.

En effet, dans les chapitres 3 et 4 nous fonderons nos études cinétiques d'interactions entre les protéines et l'ADN sur l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz. Pour ce faire, nous devons donc définir les conditions de

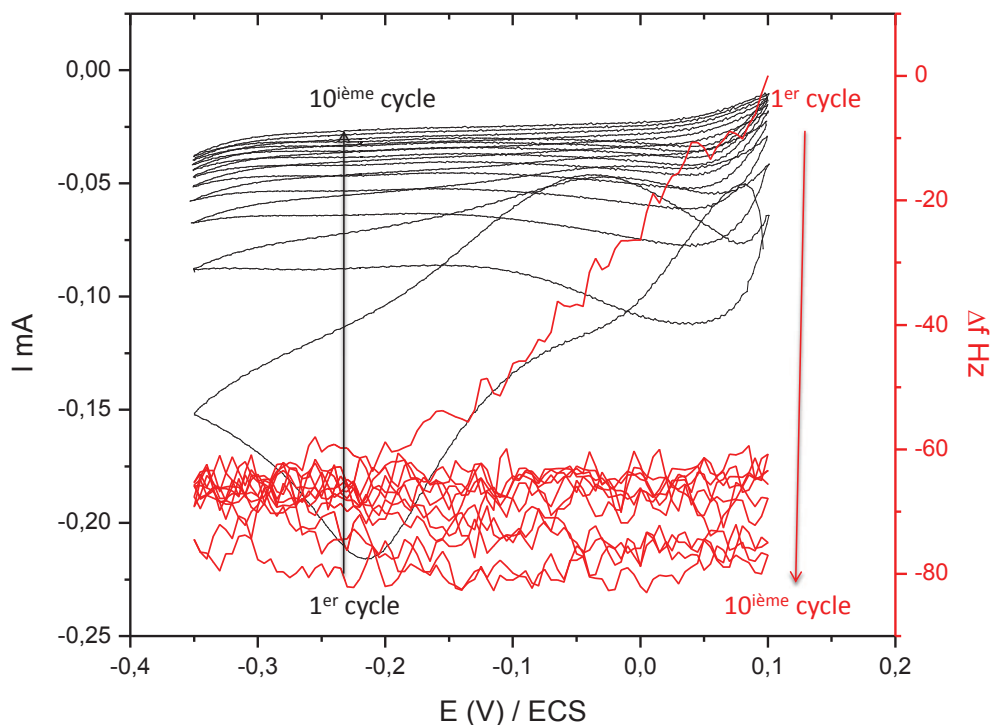
FIGURE 2.14 – **Superposition de 5 cycles durant la voltampérométrie cyclique obtenue sur électrode d'or dans une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl 1 M et en présence de 1 équivalent en NaNO_2 . La gamme de potentiels est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 100 mV/s.**



formation de la couche organique $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ sur la surface d'un cristal de quartz d'or. Nous avons ainsi enregistré les voltampérogrammes cycliques d'une solution d'acide sulfanilique (5 mM) en milieu HCl (1 M) en présence d'un équivalent en NaNO_2 . L'électrode de travail étant le cristal de quartz d'or, nous avons, en parallèle de la voltampérométrie cyclique, enregistré la variation de la fréquence du cristal de quartz lors de l'application du potentiel électrochimique (cf. figure 2.15).

Ainsi, dans la figure 2.15, la voltampérométrie cyclique présente, lors du premier cycle un pic de réduction irréversible ($E \approx -0,21\text{V}/\text{ECS}$), dont le courant de pic disparaît complètement lors du deuxième cycle. En parallèle, la variation de la fréquence diminue (ce qui traduit une prise de masse) durant le premier cycle correspondant à l'accroche des espèces radicalaires formées

FIGURE 2.15 – **Superposition des voltampérogrammes cycliques et des variations de la fréquence enregistrés par la microbalance à cristal de quartz couplée électrochimiquement (E-QCM) lors de la réduction du sel d'aryldiazonium généré in situ à partir de l'acide sulfanilique (5mM) en présence de 1 équivalent de NaNO₂ (5mM) dans HCl 1M sur un cristal de quartz d'or. La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 50 mV/s.**



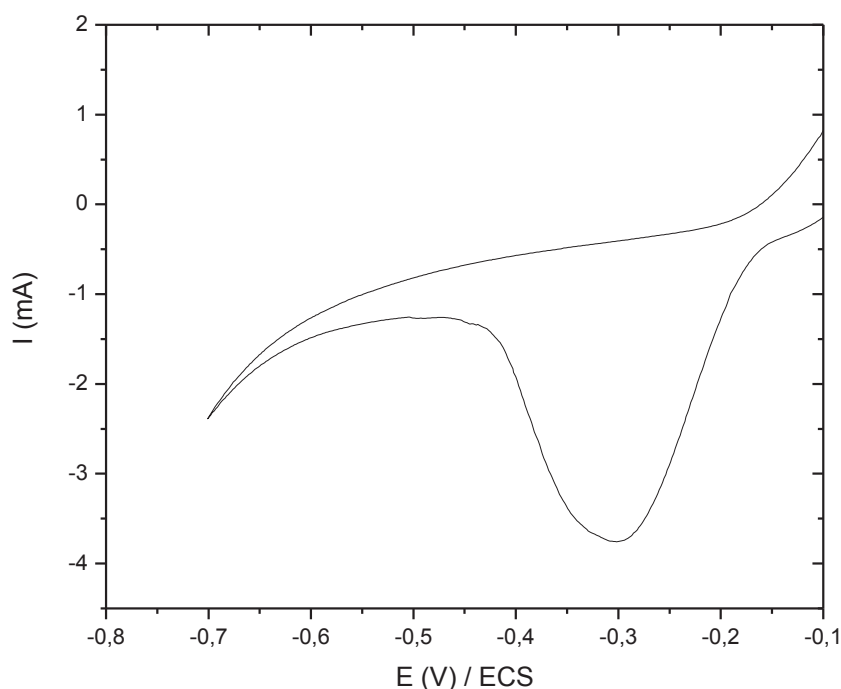
suite à la réduction du sel de diazonium ($\Delta f \approx 70 - 75 \text{ Hz} \approx 70 - 75 \text{ ng}$). Lors du deuxième cycle, la microbalance à cristal de quartz n'enregistre quasiment pas de variation de la fréquence. Ainsi, on observe simultanément la disparition du courant de pic de réduction et une non-variation de la fréquence, ce qui traduit bien une passivation complète de l'électrode de travail (cristal de quartz d'or), et cela dès la fin du premier cycle.

Dernièrement, on peut noter en comparaison avec la première molécule utilisée (cf. section 2.2.1), que la masse introduite sur la surface est environ 21 fois inférieure dans le cas de l'acide sulfanilique. Du fait d'une très faible masse

et d'une bonne passivation (contrairement à ce que l'on avait pu observer dans la figure 2.6), nous pouvons supposer que cette modification de surface se rapproche de la mono-couche organique.

Modification électrochimique sur une surface de chrome par réduction de sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique

FIGURE 2.16 – *Voltampérométrie cyclique effectué sur une surface de chrome dans une solution d'HCl (1 M) en présence d'acide sulfanilique (5 mM) et d'un équivalent en NaNO₂. La gamme de potentiel donnée est comprise entre -0,1 et -0,7 V/ECS. Vitesse de balayage de 100 mV/s.*



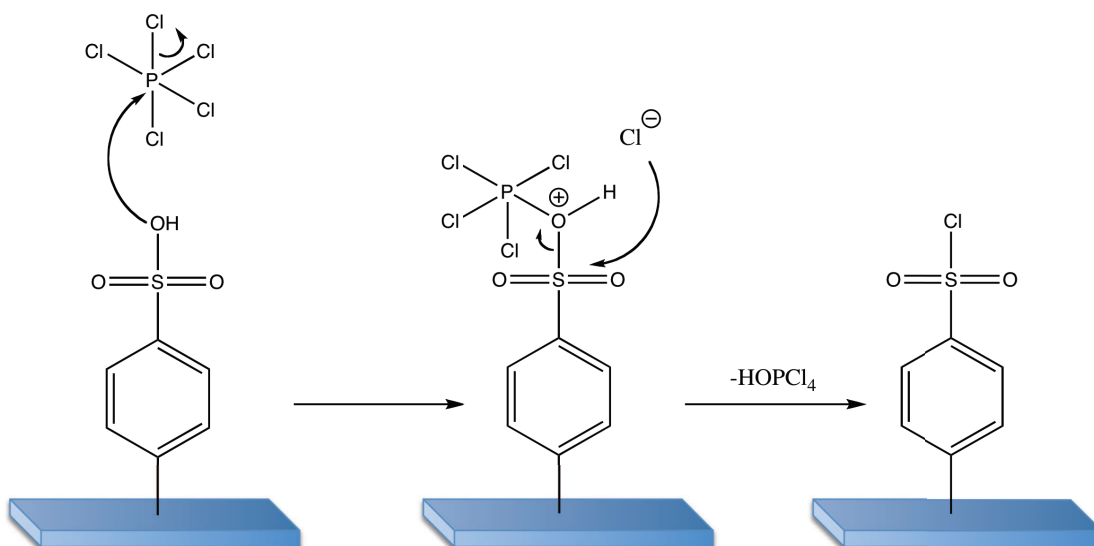
Nous avons également effectué la réduction du sel d'aryldiazonium formé *in situ* à partir de l'acide sulfanilique (1 équivalent en NaNO₂) sur une surface de chrome possédant une rugosité d'environ 0,2 nm. Pour cette modification, nous avons toujours produit la surface avec un seul cycle en voltampérométrie cyclique, pour limiter la production de multi-couche organique. Cette surface modifiée de chrome sera utilisée pour les études d'XPS et de mesure concernant l'épaisseur de couche par AFM. Nous l'utiliserons également dans les

chapitre faisant intervenir des complexes biologiques comportant de petites tailles (comprises entre 1 et 10 nm). Nous pouvons voir dans la figure 2.16, un unique pic de réduction centré à -0,3 V/ECS caractéristique de la réduction des sels d'aryldiazonium. La surface sera ensuite étudiée non seulement par XPS (détermination de chaque élément de la couche organique) mais également par AFM (mesure de rugosité et d'épaisseur de couche organique).

2.2.3 Chlorination de Ar-SO₃H en Ar-SO₂Cl par PCl₅ et démonstration par voltampérométrie cyclique

Pour permettre l'utilisation de la surface comme biorécepteur, il est nécessaire d'activer la couche organique Ar-SO₃H pour obtenir la fonction d'ancrage de type Ar-SO₂Cl. Nous effectuons alors la chloration de la couche organique en appliquant une solution de CH₂Cl₂ contenant 5 mM de PCl₅ (application de la solution pendant 5 min avec agitation à température ambiante). La réaction de chloration des fonctions Ar-SO₃H s'opère selon le schéma réactionnel suivant :

FIGURE 2.17 – **Schéma général de la réaction de PCl₅ sur la couche organique Ar-SO₃H**



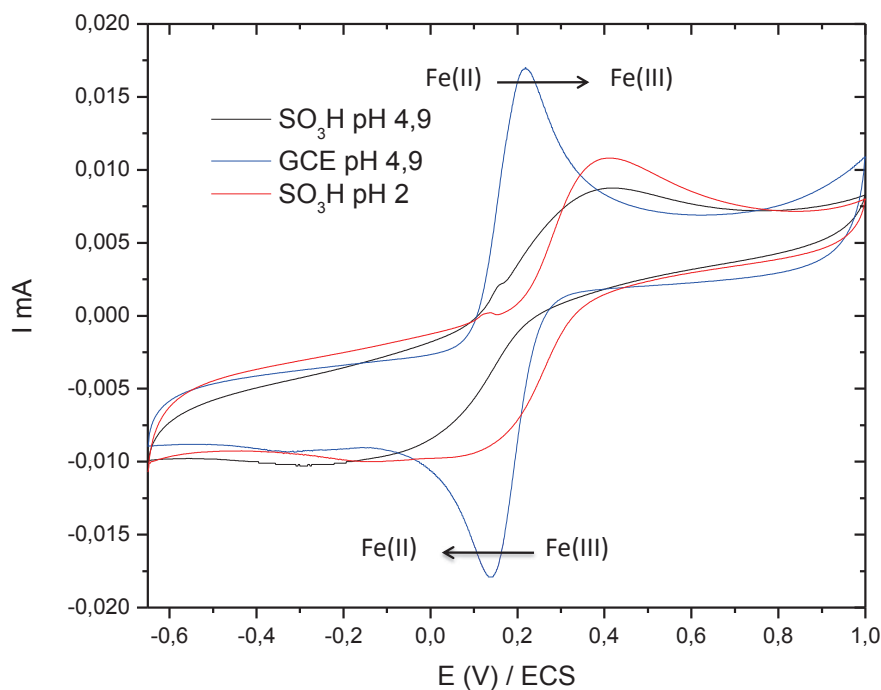
Pour visualiser par électrochimie le changement d'état de la surface, en particulier, la chlorination de Ar-SO₃H en Ar-SO₂Cl, nous nous sommes basé sur les propriétés électrostatiques de la surface sous la forme Ar-SO₃H. En effet, la fonction Ar-SO₃H possède un pKa de 3,24. [108] Ainsi, au-dessus d'un pH de 3,24, le groupement SO₃H se trouve sous une forme dissociée chargée négativement. Il a ainsi été reporté dans de nombreux exemples, que lorsque l'on place une sonde redox négative en solution et que l'on enregistre le voltampérogramme cyclique, le potentiel de pic (et tout particulièrement l'écart en potentiel ΔE entre le pic d'oxydation et le pic de réduction) de la sonde dépendra des propriétés électrostatiques de la surface. Ainsi, pour une surface chargée négativement, la sonde redox sera localement repoussée de la surface, le transfert électronique entre la surface et la solution est alors plus difficile. Ce phénomène se traduira par une diminution du courant de pic et par un élargissement du ΔE . [111, 108]

Nous utiliserons alors les propriétés électrostatiques de la surface et l'effet de répulsion qu'elles génèrent sur le couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, pour justifier du passage de la fonction Ar-SO₃H à la fonction Ar-SO₂Cl. L'utilisation de ce couple redox est justifiée par son signal reproductible et servant de modèle dans littérature (avec le $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ dans le cas de sondes redox positives). On utilisera donc deux tampons phosphate (10 mM en K₃HPO₄/KH₂PO₄, servant de sel support), l'un à pH 2 (inférieur au pKa) et l'autre à pH 4,9 (supérieur au pKa), contenant en quantité équimolaire le couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à 5 mM. On utilise une quantité équimolaire du couple redox pour avoir un signal équivalent en oxydation et en réduction.

Nous avons tout d'abord enregistré les voltampérogrammes cycliques pour une électrode de carbone native et modifiée par la couche organique Ar-SO₃H dans les différents tampons (pH 2 et 4,9) contenant 5 mM du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (cf. figure 2.18).

Dans la figure 2.18, la voltampérométrie cyclique du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ enregistré sur électrode de carbone non modifiée, présente un pic d'oxydation à $E_{GCE}^{ox}(pH4,9) = +0,23V$ correspondant à l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) et un pic de réduction à $E_{GCE}^{red}(pH4,9) = +0,13V$ correspondant à la réduction du Fe(III) en Fe(II), en accord avec les signaux enregistrés dans la littérature. Ce système caractéristique présente un faible écart de potentiel,

FIGURE 2.18 – **Voltampérométrie cyclique appliquée à une électrode de carbone native et modifiée par Ar-SO₃H dans un tampon phosphate (10 mM K₃HPO₄/KH₂PO₄) contenant 5mM du couple [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ à différents pH (2 et 4,9). La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 10 mV/s.**

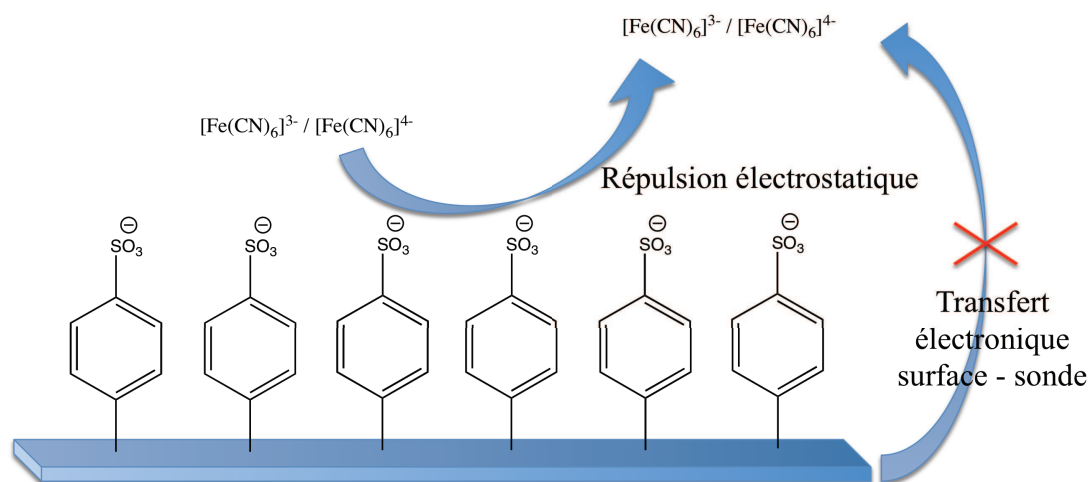


$\Delta E_{GCE}(pH4,9) = E_{GCE}^{ox} - E_{GCE}^{red} = 0,10V$, entre les pics d'oxydation et de réduction. Ce faible écart de potentiel est caractéristique d'un transfert électronique efficace entre l'électrode et l'espèce en solution.

Au contraire, pour un pH de 4,9, lorsque l'électrode est modifiée par la couche organique Ar-SO₃H, la voltampérométrie cyclique pour la sonde redox [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ présente un système Ox/Red avec un courant beaucoup moins important que lorsque l'électrode n'est pas modifiée. De plus, ce système présente un écart de pic à pic $\Delta E_{ArSO_3H}(pH4,9) = 0,63V$ caractéristique d'un lent transfert électronique. De plus, pour pouvoir enregistrer les pics d'oxydation et de réduction, nous avons dû balayer la gamme de potentiel avec une vitesse de 10 mV/s, sans quoi nous ne pouvons observer les signaux du couple redox [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻. Ce faible transfert électronique est dû,

d'une part, à la passivation de l'électrode provoquée par la modification de la surface lors de la réduction d'un sel d'aryldiazonium. D'autre part, l'électrode étant fonctionnalisée par des fonctions Ar-SO₃H sous forme dissociées, chargées négativement à pH 4,9, celles-ci expulsent la sonde redox de la surface de l'électrode (cf. schéma de la figure 2.19). Ceci implique un abaissement du transfert électronique, et par conséquent une augmentation de la différence de potentiel ΔE de pic à pic.

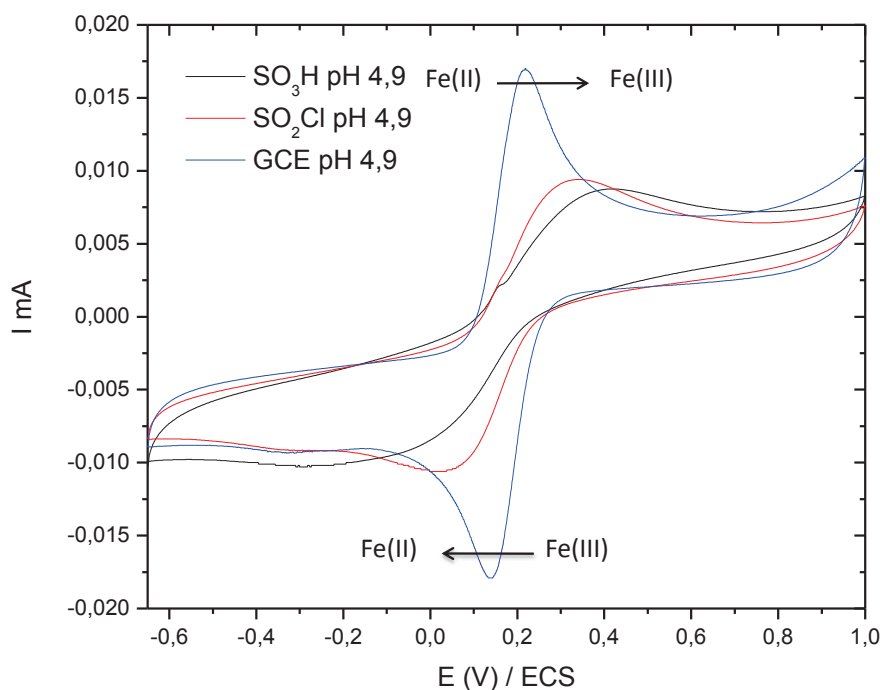
FIGURE 2.19 – **Principe de la répulsion d'une sonde redox provoquée par la présence des groupements Ar-SO₃⁻ et de son impact sur le transfert électronique entre l'électrode et la solution.**



Dans le cas où le pH est de 2 (inférieur au pKa), la couche organique se trouve sous une forme neutre. On constate pour le voltampérogramme cyclique de la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ une différence de potentiel de pic-à-pic $\Delta E_{\text{ArSO}_3\text{H}}(\text{pH}2) = 0,40\text{V}$ contre $\Delta E_{\text{ArSO}_3\text{H}}(\text{pH}4,9) = 0,63\text{V}$ dans le cas où la surface est chargée négativement. Cette différence entre les deux ΔE en fonction du pH, montre bien l'impact de l'état de la surface sur le voltampérogramme cyclique de la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. On peut alors supposer que dans le cas d'une couche organique présentant des fonctions de type Ar-SO₂Cl, il y aura par comparaison moins d'interactions électrostatiques entre la surface et la sonde redox.

Nous avons, par la suite, comparé des électrodes de carbone native et modifiée par la couche organique Ar-SO₃H puis par Ar-SO₂Cl en se plaçant en présence de la sonde redox [Fe(CN)₆]³⁻ / [Fe(CN)₆]⁴⁻ en quantité équimolaire (5 mM) dans un tampon phosphate (10 mM K₃HPO₄/KH₂PO₄) à pH 4,9 (cf. figure 2.20). On se place à pH 4,9 pour pouvoir rendre compte du changement d'état de la surface suite à la réaction de PCl₅ sur les fonctions Ar-SO₃H (passage d'une forme chargée à une forme neutre).

FIGURE 2.20 – **Voltampérométrie cyclique appliquée à une électrode de carbone native et modifiée par Ar-SO₃H ou par Ar-SO₂Cl dans un tampon phosphate (10 mM K₃HPO₄/KH₂PO₄) contenant 5 mM du couple redox [Fe(CN)₆]³⁻ / [Fe(CN)₆]⁴⁻ à pH 4,9. La gamme de potentiel est donnée par rapport à l'ECS, vitesse de balayage de 10 mV/s.**



Dans la figure 2.20, le voltampérogramme cyclique du couple redox [Fe(CN)₆]³⁻ / [Fe(CN)₆]⁴⁻ enregistré sur l'électrode modifiée par Ar-SO₂Cl présente un pic d'oxydation à $E_{ox}^{ArSO_2Cl}(pH4,9) = +0,350V$ et un pic de réduction $E_{red}^{ArSO_2Cl}(pH4,9) = +0,015V$. Soit un écart de pic-à-pic $\Delta E_{ArSO_2Cl}(pH4,9) = 0,335V$ pour l'électrode modifiée par Ar-SO₂Cl contre un $\Delta E_{ArSO_3H}(pH4,9) = 0,630V$ pour l'électrode

modifiée par Ar-SO₃H pour un tampon phosphate à pH 4,9. Tout premièrement, on peut constater que l'on conserve une partie de la réversibilité due à la modification de la surface comparée à la réponse obtenue sur l'électrode de carbone non modifiée. En revanche, on constate une baisse de réversibilité (diminution du ΔE) comparée à l'électrode modifiée par Ar-SO₃H pour le même tampon à pH 4,9. Cette diminution vient du fait que la surface modifiée par Ar-SO₂Cl ne présente pas de charge négative (d'effet électrostatique venant de la surface) contrairement à la surface modifiée par Ar-SO₃H qui se trouve à ce pH sous sa forme dissociée chargée négativement.

On peut donc supposer que l'application de la solution de PCl₅ (5 mM) / CH₂Cl₂ apporte une modification de surface qui peut être attribuée à la transformation de Ar-SO₃H en Ar-SO₂Cl, de part la perte de l'effet de résistivité due aux propriétés électrostatiques. On constate néanmoins, que l'électrode modifiée par la couche organique Ar-SO₂Cl possède toujours une certaine résistance au transfert électronique, caractéristique de ce type de modification électrochimique (électrogreffage lors de la réduction de sel d'aryldiazonium).

2.2.4 Caractérisation de la couche organique Ar-SO₃H / SO₂Cl par XPS et par AFM

Nous avons pu voir, en utilisant l'électrochimie, le changement d'état de la surface lors des différentes étapes de modifications électrochimiques et chimiques. Cependant, l'électrochimie ne nous permet pas d'avoir une connaissance exacte de la composition de la couche organique ni de sa morphologie. Afin de connaître ces paramètres, nous avons étudié chaque étape de modification jusqu'à l'obtention de la couche organique Ar-SO₂Cl sur des surfaces d'or et de chrome par XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) et par AFM. Les études par XPS sont tout à fait pertinentes pour déterminer la composition chimique de la couche organique. Quant à l'AFM, elle permet d'accéder à la morphologie de la surface et de déterminer sa rugosité et son épaisseur sur surface de chrome.

Dans le but d'obtenir des surfaces avec la plus faible épaisseur possible, nous avons appliqué pour chaque surface un unique balayage des potentiels lors de la réduction du sel d'aryldiazonium formé *in situ* à partir de l'acide sulfanilique en présence d'un équivalent de NaNO₂. Après chaque étape la sur-

face est analysée par l'XPS (modèle : Leybold 30, à l'Institut des Matériaux de Nantes). Ainsi, pour chaque surface, on enregistre un spectre large contenant toutes les énergies de liaisons des différents éléments présents à la surface, puis nous enregistrons des spectres centrés sur les gammes énergétiques correspondant aux atomes de Carbone, d'Oxygène, de Soufre, de Chlore et du Métal composant le substrat.

Analyse XPS des couches organiques Ar-SO₃H / SO₂Cl greffées sur surfaces d'or

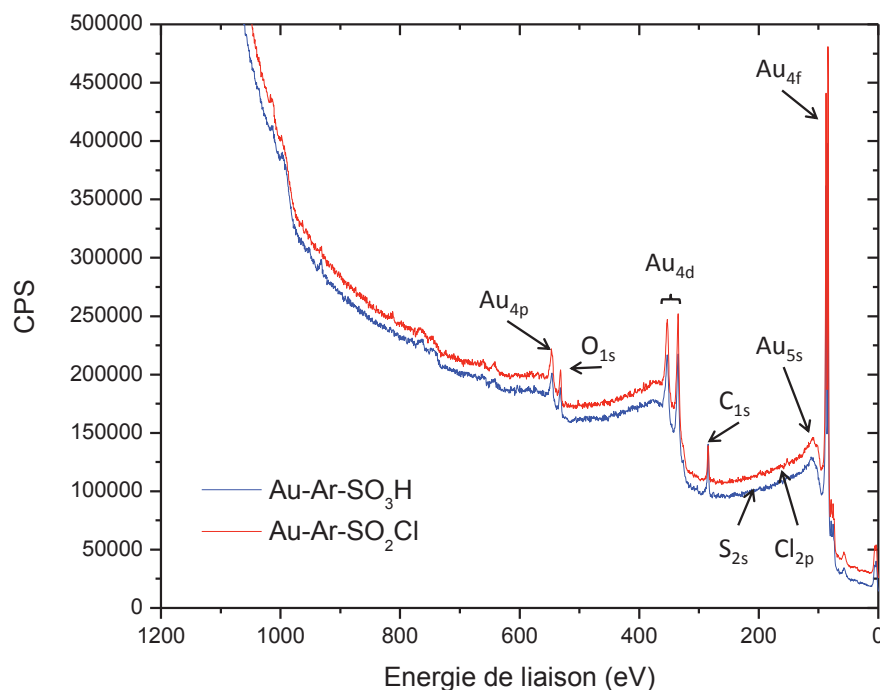
Nous avons utilisé les surfaces d'or utilisées précédemment pour l'AFM, auxquelles on a appliqué un cycle de potentiel compris entre + 0,1 et -0,7 V par rapport à l'ECS. On a appliqué un seul cycle afin d'être dans les mêmes conditions que pour l'AFM. Contrairement au chrome dont l'étude sera présentée à la section suivante, nous nous limiterons pour les couches greffées sur or à une simple analyse de la présence des différents éléments sur la surface.

Nous enregistrons d'abord un spectre large (énergie de liaison de 1200 à 0 eV) des surfaces d'or modifiées par la couche organique Ar-SO₃H. Puis, après application de PCl₅ pour l'obtention de la couche organique Ar-SO₂Cl. Nous sommes en mesure de fixer des gammes plus étroites et mieux résolues en énergies pour permettre l'étude d'éléments spécifiques de la couche organique.

Dans la figure 2.21, nous représentons d'abord la superposition des spectres larges pour les deux couches organiques. Au sein de ceux-ci, on retrouve les bandes caractéristiques de l'or correspondant aux différentes couches électroniques de l'atome, l'Au_{4p} à 550 eV, l'Au_{4d} à 340 - 350 eV, l'Au_{5s} à 110 eV et l'Au_{4f} à \approx 90 eV. On retrouve également dans le spectre large la présence des bandes caractéristiques du carbone C_{1s} aux environs de 285 eV et de l'oxygène O_{1s} aux environs de 535 eV. Les bandes du soufre S_{2p} et du chlore Cl_{2p} sont légèrement visible dans le spectre large à respectivement, 152 eV et 197 eV.

De plus, l'XPS permet, par élément donné, de séparer les différentes contributions par décomposition de bandes et ainsi de déterminer l'environnement de l'atome. Ainsi, pour le carbone C_{1s}, en enregistrant un spectre étroit entre 295 et 280 eV, on peut visualiser l'ensemble des énergies de liaisons dues à son environnement. Pour ce faire, on décompose la courbe représentant le carbone

FIGURE 2.21 – **Spectres XPS larges d'une surface d'or modifiée par les couches organiques $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ / SO_2Cl formées par réduction du sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique**



C_{1s} en plusieurs composantes (modèle Gaussiennes/Lorentziennes). A chaque contribution est attribuée une énergie qui est caractéristique des liaisons chimiques et de l'environnement du carbone C_{1s} . Par exemple, la bande centrée à 284,2 eV est généralement attribuée au carbone sp^2 , qui est impliqué dans une double liaison carbone-carbone ou dans un cycle aromatique. A 284,1 eV, on y attribue également la liaison C-Au dans le cas de la réduction des sels d'aryldiazonium. [110]

On note également pour la bande du soufre S_{2p} centrée à 162 eV, qui possède deux bandes d'énergies après déconvolution. Ces deux bandes sont associées à l'énergie de liaison du $\text{S}_{2p_{1/2}}$ et du $\text{S}_{2p_{3/2}}$, respectivement à 163,4 eV et 161,5 eV caractéristiques de la liaison soufre-carbone.

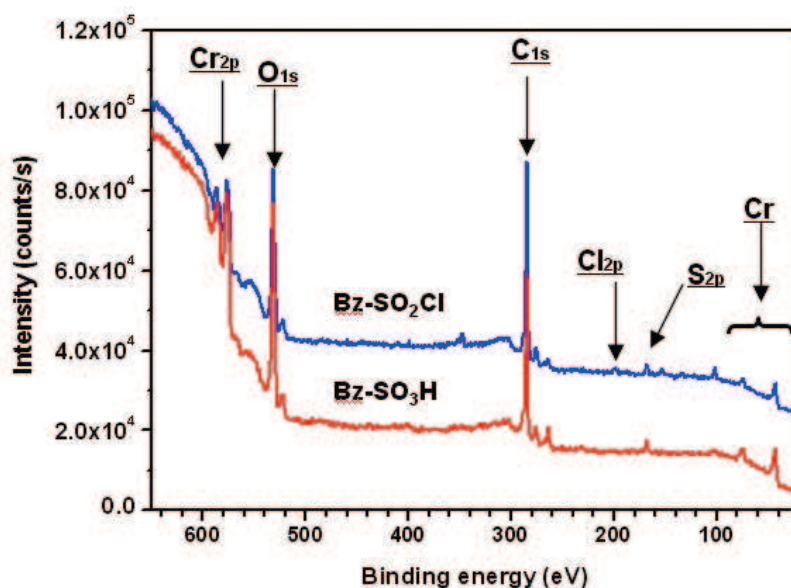
Dernièrement, on note la présence du chlore Cl_{2p} , d'or et d'oxygène, en accord avec la structure chimique attendue.

Cette première étude nous a permis de mettre en évidence la présence des différents éléments constituant la couche organique fixée à la surface d'or et l'apparition du chlore après application d'une solution de PCl_5 sur la couche organique $\text{Ar-SO}_3\text{H}$.

Analyse XPS des couches organiques $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ / SO_2Cl greffées sur sur surfaces de chrome

Nous avons opéré de la même façon pour l'analyse des surfaces de chrome modifiées par $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ / SO_2Cl . Nous avons enregistré d'abord un spectre large des deux surfaces dont la superposition est représentée figure 2.22.

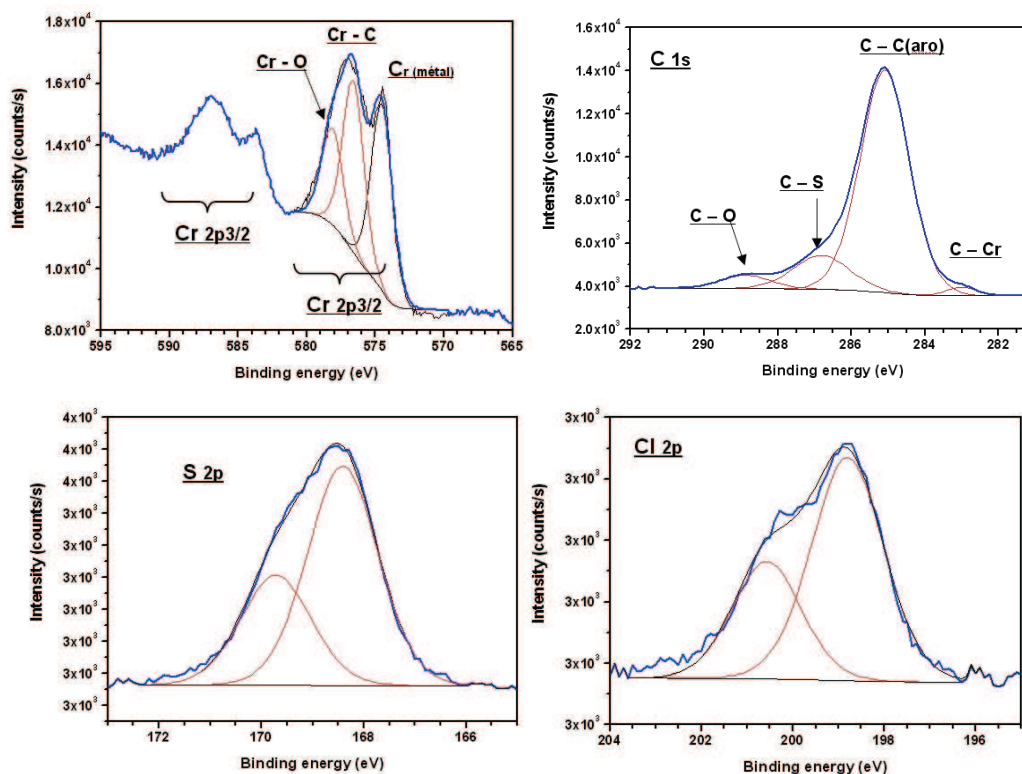
FIGURE 2.22 – *Spectres XPS larges obtenus sur des surfaces de chrome modifiées par les couches organiques $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ / SO_2Cl , formées par réduction du sel d'aryldiazonium généré in situ à partir de l'acide sulfanilique*



Dans la figure 2.22, on constate la présence des différents éléments chimiques Cr, O, C, S attendus pour une modification par la couche organique $\text{Ar-SO}_3\text{H}$. Nous avons aussi celui du Cl pour la couche organique $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. On peut également remarquer que le signal de l'azote se trouvant normalement à 403 eV n'est pas présent.

Nous enregistrons alors les spectres étroits de chaque élément Cr_{2p} , C_{1s} , O_{1s} , S_{2p} et Cl_{2p} .

FIGURE 2.23 – **Spectres XPS des différents éléments présents à la surface Cr_{2p} , C_{1s} , S_{2p} et Cl_{2p} après greffage de $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ et $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. Pour la modification de surface par $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ on présentera uniquement le spectre du Cl_{2p} , car on retrouve les mêmes spectres pour les autres éléments que ceux de la modification par $\text{Ar-SO}_3\text{H}$.**



Les spectres XPS étroits de chaque élément ne présentent pas de réelles différences entre les deux surfaces ($\text{Ar-SO}_3\text{H}$ et $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$), hormis l'apparition de la bande du Cl_{2p} . Ainsi, seuls les spectres de la surface modifiée par la couche organique $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ sont représentés dans la figure 2.23. On retrouve donc les bandes caractéristiques du Cr_{2p} , C_{1s} , S_{2p} et du Cl_{2p} aux énergies de liaisons respectivement à 573,4-576,8 eV, 282,9-288 eV, 168,4 eV et 198,8 eV.

La bande à 576,8 eV correspond au pic du $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$ provenant de la liaison Cr-

Cr de la surface métallique. Et la bande centrée à 573,4 eV peut être attribuée aux électrons du $\text{Cr}_{2p3/2}$ des liaisons $\underline{\text{Cr-O}}$ et $\underline{\text{Cr-C}}$.

La présence de deux pics aux énergies de 531,7 et de 168,4 eV, correspondant respectivement aux électrons de l' O_{1s} et du $\text{S}_{2p3/2}$, confirme la présence de groupements de type SO_2R . [112, 113] De plus, la présence d'une bande bien définie à 198,8 eV pour le $\text{Cl}_{2p3/2}$ nous indique la présence du groupement SO_2Cl . On peut alors quantifier la quantité de Cl en effectuant le rapport entre la quantité de Cl_{2p} et le S_{2p} . La conversion peut alors être estimée à 76% des groupements SO_3H en SO_2Cl après traitement par PCl_5 .

La décomposition des pics correspondant aux énergies électroniques du C_{1s} révèle la présence de quatre contributions. En suivant les attributions proposées par Wu *et al.* et Hinge *et al.*, [114, 115, 116] nous pouvons assigner les bandes à 282,9 eV aux liaisons $\underline{\text{C-Cr}}$, à 285,1 eV aux liaisons $\underline{\text{C}_{aro}\text{-Cr}}$, à 286,8 eV aux liaisons $\underline{\text{C-S}}$ et à 288,9 eV aux liaisons $\underline{\text{C-O}}$. De plus, on peut noter l'absence d'atome d'azote à la surface (normalement présent pour des énergies comprises entre 395 et 410 eV). Ceci confirme le greffage d'espèces selon le procédé général de la réduction des sels d'aryldiazonium (*via* la production de radicaux). Enfin, le pic caractéristique à 576,8 eV provenant de la liaison $\underline{\text{Cr-C}}$ suggère bien la présence d'une couche organique compacte liée à la surface de l'électrode.

Mesure de l'épaisseur de la couche organique selon la méthode de "scratching" par AFM

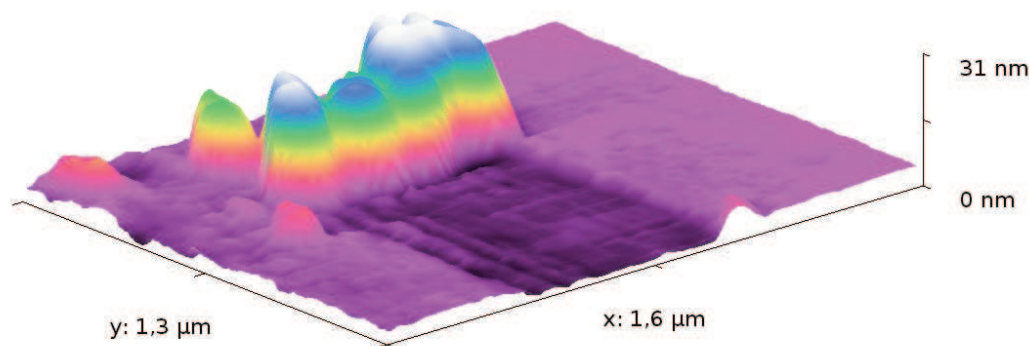
Nous avons pu *via* l'XPS déterminer la présence des différents éléments constituant la couche organique sur les surfaces d'or et de chrome. A présent, nous utilisons l'AFM pour pouvoir visualiser l'organisation de la surface, une fois modifiée par la couche organique $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. Pour pouvoir mesurer la rugosité de la couche organique et son épaisseur de couche, il est nécessaire de partir d'une surface possédant de base une très faible rugosité. Ainsi, nous utilisons pour cette démonstration uniquement des surfaces de chrome possédant une rugosité d'environ 0,2 nm (contrairement aux surfaces d'or qui possèdent une rugosité d'environ 1,3 nm).

La technique utilisée pour caractériser la rugosité et l'épaisseur de la couche

organique sera la méthode dite de « scratching » que l'on réalise par AFM. [117, 91] En effet, lorsque l'on applique une force appropriée avec la pointe AFM, on peut traverser la couche organique jusqu'à toucher la surface métallique sans l'endommager. Nous avons pu déterminer qu'une force de $1\mu\text{N}$ permet de traverser la couche organique Ar-SO₂Cl jusqu'à la surface de chrome. Ensuite, la méthode consiste à appliquer cette force de $1\mu\text{N}$ tout en imageant la surface en mode contact avec la pointe AFM. Le fait d'être en mode contact permet, suite au passage de la pointe, de retirer toute la matière organique présente au-dessus de la surface de chrome.

Suite à la modification d'une surface de chrome par réduction du sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique, et après application d'une solution de PCl₅ (5 mM) / CH₂Cl₂, nous avons appliqué une force de $1\mu\text{N}$ via la pointe de l'AFM sur une surface de $2\times 2\mu\text{m}$. Ensuite, nous avons visualisé par AFM une surface de $10\times 10\mu\text{m}$ en mode non-contact centrée sur la partie où a été appliqué le mode contact (cf. figure 2.24).

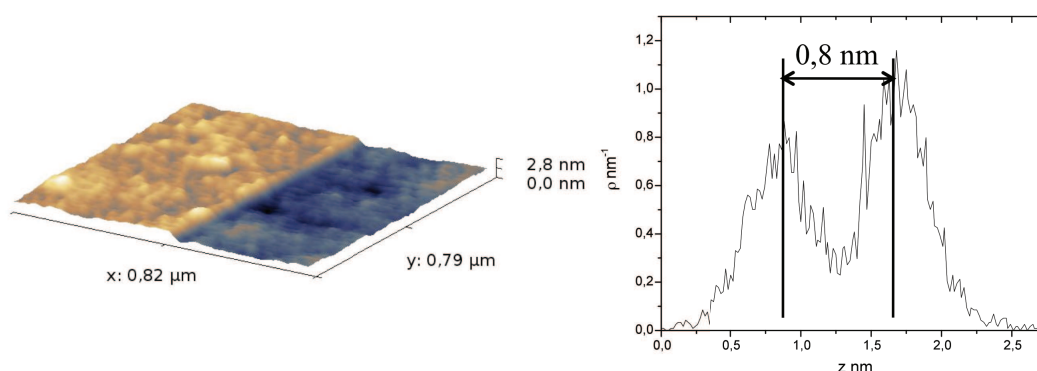
FIGURE 2.24 – **Représentation 3D de l'image obtenue en mode non contact suite à l'application d'une force de $1\mu\text{N}$ sur une surface de $2\times 2\mu\text{m}$**



Dans la figure 2.24, est représentée une vue en trois dimensions de la surface obtenue en mode non-contact après avoir appliqué une force de $1\mu\text{N}$ en mode contact. Nous pouvons visualiser d'une part, un amas de matière organique correspondant à la matière "poussée" par la pointe AFM lors de son passage en mode contact. D'autre part, nous pouvons voir la surface de chrome apparaître là où a été appliqué le mode contact. Ce qui nous permet de détermi-

ner une marche de hauteur entre la surface de chrome et la couche organique déposée sur le reste de la surface. Pour estimer correctement la hauteur de marche entre la surface de chrome et la couche organique, on reporte la distribution des hauteurs (surface de chrome plus la couche organique, se reporter à la figure 2.25).

FIGURE 2.25 – Représentation 3D de l'image AFM obtenue entre les deux régions chrome et couche organique; distribution des hauteurs pour l'image complète, la différence entre les deux hauteurs principales nous donne la hauteur de marche entre la surface de chrome et la couche organique.



Ainsi, lorsque l'on reporte la distribution de hauteur en fonction de z (la hauteur), et en faisant l'écart entre les deux maximum des populations de hauteurs, on obtient la hauteur de marche moyenne entre la surface de chrome et la couche organique déposée à la surface. On obtient ainsi une hauteur de marche de 0,8 nm. Cette hauteur de 0,8 nm est relativement proche de la valeur théorique de 0,7 nm que l'on pourrait obtenir pour des groupements de types $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$. Ceci nous permet de dire que les conditions de modifications de surface par la réduction du sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique en milieu HCl 1M et en présence d'un équivalent de NaNO_2 et après application d'une solution de PCl_5 (5 mM) / CH_2Cl_2 , permettent d'obtenir une couche organique $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$ de l'ordre de la mono-couche organique.

De plus, la rugosité mesurée après modification est comprise entre 0,2 et 0,3 nm, ce qui correspond à la rugosité de base de la surface de chrome. En plus d'obtenir une couche organique dont l'épaisseur est de l'ordre de la mono-

couche, on obtient bien une couche organique très régulière sur la surface de chrome. Ces particularités nous permettent d'envisager la visualisation par AFM de complexes ADN/Protéines qui possèdent généralement des hauteurs comprises entre 1 et 20 nm.

2.3 Réactivité de la surface ; vers l'accroche d'ADN

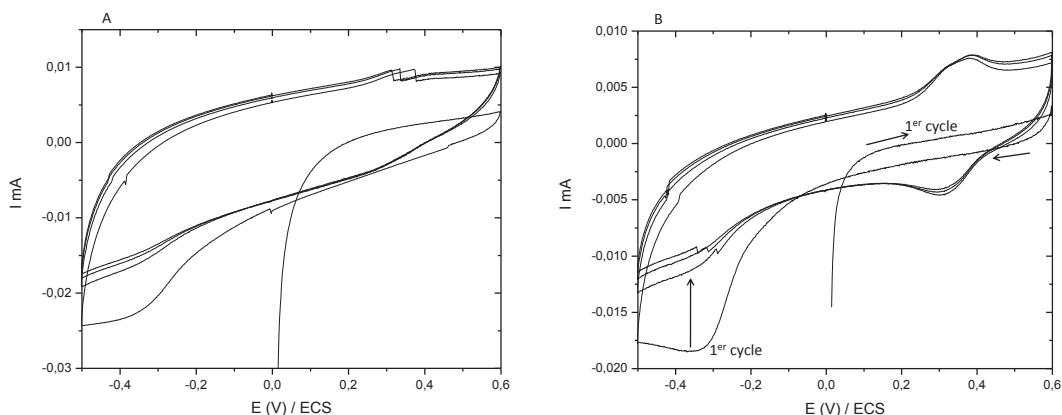
Nous avons pu montrer qu'il était possible de modifier une surface par électrogreffage d'un aryl radical provenant de la réduction d'un sel d'aryldiazonium généré *in situ* à partir de l'acide sulfanilique pour former une couche organique de type Ar-SO₃H à la surface de l'électrode. Puis, nous avons pu modifier cette couche organique en l'activant par PCl₅ pour former des groupements de types Ar-SO₂Cl. Nous allons à présent tester cette couche organique pour l'immobilisation d'ADN non modifié. Avant d'immobiliser de l'ADN, nous avons testé la fonction d'ancrage sur une électrode de carbone modifiée *via* la fixation d'une molécule "modèle" comportant un alcool primaire (de façon similaire à l'extrémité de l'ADN) et une fonction électro-active permettant sa détection par voltampérométrie cyclique, l'alcool de *para*-nitrobenzyle.

2.3.1 Réactivité vis-à-vis d'un nucléophile électrochimique modèle

Pour pouvoir étudier la réactivité de la surface, nous avons comparé le signal électrochimique d'une électrode de carbone modifiée par Ar-SO₃H et par Ar-SO₂Cl après que celles-ci aient réagi avec une solution d'alcool de *para*-nitrobenzyle. L'alcool de *para*-nitrobenzyle (5 mM) est diluée dans un tampon phosphate (10 mM K₃HPO₄ / KH₂PO₄ à pH 7,4). Les deux électrodes modifiées sont immergées pendant 5 minutes dans la solution d'alcool *para*-nitrobenzyle, puis elles sont rincées et nettoyées dans un bain à ultra-sons pour éliminer les possibles résidus adsorbés. Nous enregistrons ensuite les voltampérogrammes cycliques pour les deux électrodes dans une solution d'HCl 1M.

La figure 2.26-B illustre les voltampérogrammes cycliques de l'électrode de carbone modifiée par la couche organique Ar-SO₂Cl suite à l'immersion de celle-ci dans la solution de l'alcool de *para*-nitrobenzyle. Celui-ci nous montre au premier balayage un unique pic de réduction irréversible à $E_{red}^1 = -0,35V$

FIGURE 2.26 – **Voltampérométrie cyclique pour une électrode de carbone modifiée par A : Ar-SO₃H et B : Ar-SO₂Cl dans une solution HCl 1M par rapport à l'ECS pendant 5 cycles, vitesse de balayage de 100mV/s. Les deux électrodes ont préalablement été immergées 5 min dans une solution tampon phosphate (0,1 M K₃HPO₄/KH₂PO₄) contenant 5 mM de l'alcool de para-nitrobenzyle puis rincées et passées au bain à ultrason.**



qui disparaît au cours des cycles suivants. Au cours du second balayage, on constate un nouveau système redox centré à $E_{ox/red}^2 = +0,35V$ avec un pic d'oxydation à $E_{ox}^2 = +0,40V$ et un pic de réduction à $E_{red}^2 = +0,30V$ et un écart de pic-à-pic $\Delta E_{ox/red}^2 = +0,10V$. On constate également que ce système redox perdure au cours des différents cycles suivant le second balayage. De plus, l'ensemble de ces différents systèmes redox ne sont présents que sur la figure 2.26-B c'est-à-dire pour l'électrode modifiée par Ar-SO₂Cl. On peut donc en conclure que cette différence entre les deux voltampérogrammes cycliques correspond à la présence du *para*-nitrobenzyl à la surface de l'électrode. En effet, le premier système de réduction à -0,35 V/ECS est attribuable, d'après la littérature, à la réduction du nitro en amine (mécanisme à six électrons et six protons) en milieu acide, selon le même schéma réactionnel vu dans la section 2.2.1.

La première étape est donc la réduction du nitro en hydroxylamine (mécanisme à quatre électrons et quatre protons), qui est directement réduit en amine (mécanisme à deux électrons et deux protons). Le nouveau système réversible centré à +0,35 V/ECS correspond quant à lui à l'oxydation de l'hydroxylamine, provenant de la réduction partielle du nitro, en une fonction ni-

troso suivant un mécanisme électrochimique à $2e^-$ et $2H^+$:



Ce mécanisme réversible étant conservé au cours des différents cycles de potentiels, nous pouvons en conclure que la molécule de l'alcool de *para*-nitrobenzyle a bien été immobilisée par la fonction d'ancrage $Ar-SO_2Cl$.

2.3.2 Réactivité vis-à-vis d'un brin d'ADN non modifié

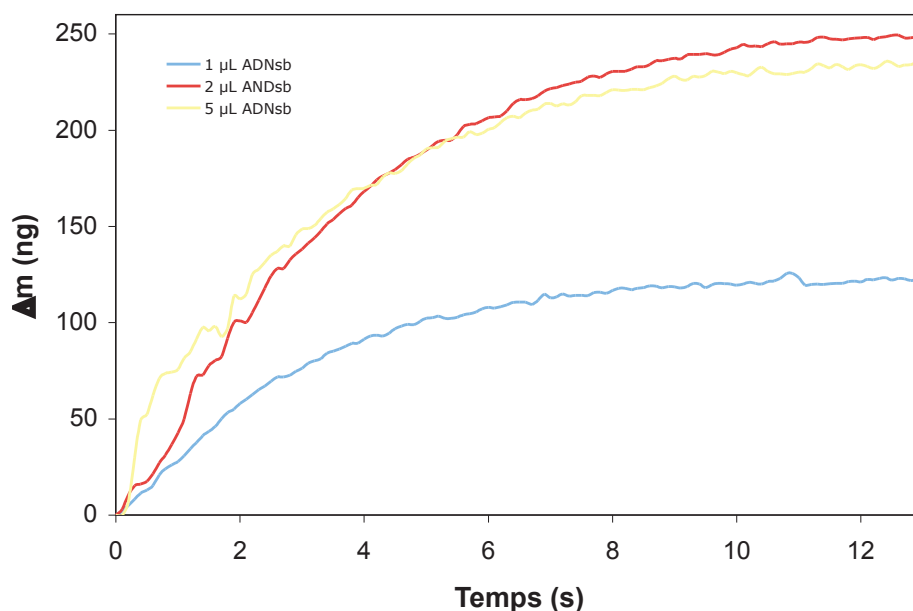
Après avoir montré la possibilité d'ajouter un nucléophile modèle par la fonction alcool sur $Ar-SO_2Cl$. Nous allons ajouter à la surface une solution contenant un simple brin d'ADN. L'ADNsb a été produit par PCR asymétrique (cf. annexe matériel et méthodes) et sera particulièrement utilisé dans le chapitre 3 dans le cas de l'interaction ADN / HsRad51. Pour vérifier l'immobilisation de l'ADNsb, nous avons employé la QCM. Nous avons alors additionné différentes quantités de la solution provenant de la PCR asymétrique (1-2-5 μL , pour une concentration, une surface modifiée).

On constate dans la figure 2.27 une rapide variation négative de la fréquence suite à l'injection de l'ADNsb (fin de la variation ≈ 15 s). Cette variation négative correspond donc à une prise de masse opérant sur la surface du quartz. De plus, on constate une augmentation de la prise de masse avec l'augmentation de la quantité d'ADNsb injectée. En revanche, on constate que pour 5 μL , que la prise de masse est moins conséquente vis-à-vis des quantités précédentes, ce qui peut nous laisser penser que nous arrivons à saturation de la surface.

Visualisation par Microscopie à Force Atomique d'un double brin d'ADN

Nous avons par la suite, envisagé de visualiser l'ADN immobilisé sur la surface. Pour ce faire, nous avons employé l'AFM. Or, pour l'ADNsb, nous n'avons pu le visualiser de façon concrète, et cela même sur des surfaces de chrome. Nous avons supposé d'une part que cela provenait de la taille de l'ADNsb (< 1 nm), et d'autre part que celui-ci n'est pas adsorbé sur la surface. Le fait qu'il ne soit pas adsorbé, implique une certaine souplesse dans le brin, et par conséquent, il est possible que celui-ci soit balayé par la pointe AFM en même temps

FIGURE 2.27 – **Suivi cinétique de l'immobilisation de solution de concentration croissante de simple brin d'ADN (1, 2 et 5 μL de produit de PCR asymétrique) non modifié par la QCM sur un cristal de quartz modifié une couche organique $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$.**



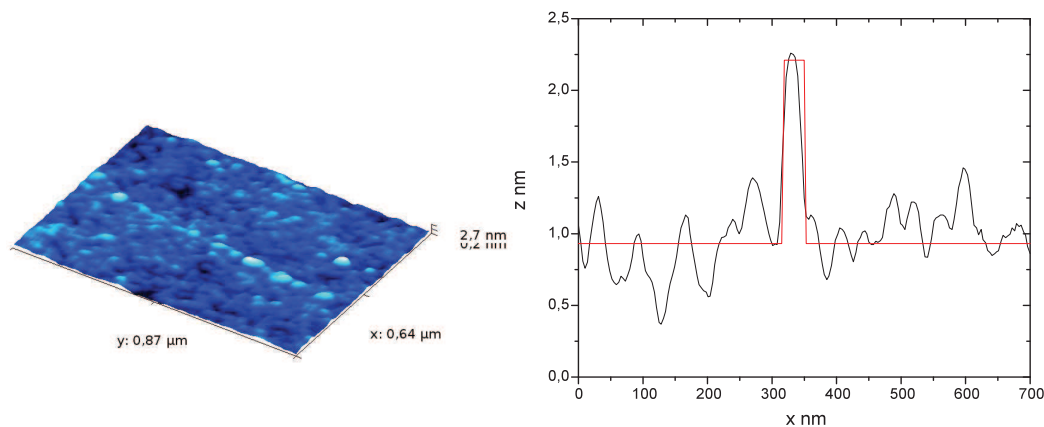
que celle-ci se déplace.

Néanmoins, dans le chapitre 4 nous serons amené à immobiliser un ADN double brin. Pour cela, il nous semblait difficile d'immobiliser directement un ADNdb (encombrement de l'extrémité). Nous avons donc, par PCR asymétrique, produit en parallèle deux ADNsb possédant une complémentarité mais de tailles différentes. Les deux brins sont ensuite hybridés pour donner un ADNdb comportant une courte séquence (environ 100 acides nucléiques) d'ADNsb dont l'extrémité libre est en 3' OH.

L'ADNdb est alors additionné sur la surface de chrome modifiée par $\text{Ar-SO}_2\text{Cl}$, dans un tampon phosphate pH 7,4. La surface est ensuite rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure puis, séchée avec de l'air comprimé, pour finalement être imagé par l'AFM.

Dans la figure 2.28, nous avons représenté un ADNdb visualisé par l'AFM. De la même manière que pour le simple brin, il a été difficile de bien visualiser

FIGURE 2.28 – *Image AFM en mode non contact à l'air d'une surface de chrome modifiée par Ar-SO₂Cl après application de l'ADN; Profil selon un axe transversal du double brin d'ADN visualisé par l'AFM.*



les ADNdb. Cependant, nous avons pu remarquer que, quand l'ADNdb est positionné à environ 90 ° de la pointe AFM, nous arrivions à en obtenir une image correcte. On peut constater d'une part que, lorsque l'on reporte le profil selon la hauteur z (nm) le long de la largeur du brin d'ADN, que celui-ci possède une hauteur (et par conséquent une largeur) d'environ 1,3 nm, en accord avec ce que l'on retrouve, pour un double brin d'ADN posé sur une surface à l'air ambiant. D'autre part, lorsque l'on mesure la longueur du brin d'ADN on trouve que celui fait 600 nm, et si l'on considère l'équivalence 90 nm pour 280 bases, nous obtenons un nombre de bases de 1800, ce qui correspond à la taille de l'ADNdb immobilisé.

2.4 Conclusion du Chapitre 2

Ainsi, après avoir fait un bilan des modifications de surfaces existantes, nous avons le choix entre la modification de surface par les SAM ou par la réduction des sels d'aryldiazonium. Du point de vue de la mise en oeuvre, les deux techniques peuvent facilement et rapidement être mises en place. Seulement, la formation d'une liaison covalente et la résistance de la couche organique formée sur la surface, par réduction électrochimique des sels d'aryldiazonium, en conservant les critères sélectionnés (rugosité homogénéité faible

épaisseur de couche), nous a obligé à nous orienter vers ce type de modification de surface.

Pour ce qui est de la fonction d'ancrage, nous sommes resté sur la fonction Ar-SO₂Cl qui avait déjà montré son efficacité lors de travaux précédents au sein du laboratoire et de la littérature. Dans l'optique de fonctionnaliser une surface par réduction électrochimique de sels d'aryldiazonium, deux possibilités s'offrent à nous. La première était l'utilisation du composé organique O₂N-Ar-SO₂Cl commercial et, pour lequel on peut obtenir facilement par réduction électrochimique un sel d'aryldiazonium dont le radical vient former une liaison covalente avec la surface. En outre, il est possible de l'utiliser pour l'immobilisation de l'ADNsb puis pour l'étude de l'interaction entre une protéine et l'ADN. Seulement, la modification, compte tenu de la nature même du composé, ne permet pas d'obtenir une couche organique de façon homogène et ne satisfait pas les caractéristiques voulues. Ainsi, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de l'acide sulfanilique comme précurseur à la réduction électrochimique *in situ* de sel d'aryldiazonium. Après avoir caractérisé les différentes étapes de la production de cette couche organique, nous pouvons conclure sur les points suivants :

- La modification s'adapte bien sur différents types de conducteurs que ce soit le carbone, l'or ou encore le chrome.

- On a pu constater, par voltampérométrie cyclique (effet bloquant important), par la QCM et par l'AFM, que la couche organique formée est bien homogène, de faible rugosité ($\approx 0,2$ nm) et de faible épaisseur sur toute la surface. Ceci, nous permet donc d'envisager une bonne sensibilité lors des mesures de variations de fréquences par la QCM (bonne marche de manoeuvre par rapport à la limitation de l'équation de Sauerbrey), et également d'une bonne résolution lors de la visualisation de complexes nucléo-protéiques.

- La modification de surface par la réduction de sel d'aryldiazonium permet d'introduire facilement une fonction d'ancrage (Ar-SO₂Cl), après une simple modification chimique. Dont on peut retrouver tous les éléments atomiques constituant la couche organique par XPS.

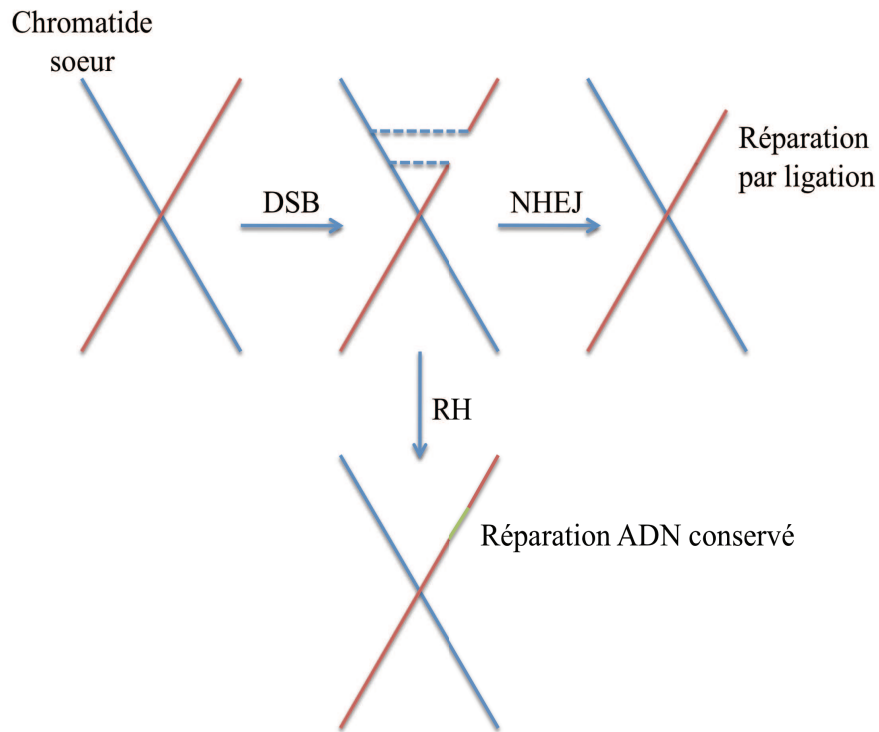
- Enfin, la fonction d'ancrage introduite possède une très bonne activité quant à l'immobilisation par liaison covalente d'espèces nucléophiles,

Chapitre 3

Etude de la formation du complexe ADNsb/HsRad51 - Vers l'inhibition de HsRad51

Avant-propos. Au cours de la vie d'une cellule, l'ADN contenu dans celle-ci peut subir de nombreux changements, que ce soit des mutations ou bien des cassures. L'origine de ces changements peut provenir de facteurs internes à la cellule lors des processus impliquant l'ADN, ou bien provenir également d'éléments extérieurs comme les rayonnements ou les produits chimiques. Ces changements au sein même de la composition de l'ADN peuvent entraîner des changements radicaux sur le génome, conduire vers l'apoptose de la cellule (ou mort cellulaire) ou encore provoquer des cancers. Pour éviter ces changements radicaux au sein du génome, il existe des processus de réparations de l'ADN très bien conservés, qui se retrouvent de la bactérie à l'homme (procaryote et eucaryote). Il existe deux processus de réparation de l'ADN double brin faisant suite à une cassure double brin également appelée DSB (DSB pour Double Strand Break). Le premier processus est la recombinaison non homologue ou NHEJ (pour Non Homologous End Joining) qui permet de joindre les deux morceaux de l'ADNdb ayant subi une DSB *via* des enzymes appelées enzymes de ligation. L'autre processus est la recombinaison homologue ou RH (ou encore HR pour homologous recombinaison). La RH permet de reconstruire la partie flanquante de l'ADNdb ayant subi une DSB à partir de la chromatide soeur. Elle permet donc, contrairement à la NHEJ, de conserver toute l'information génétique perdue lors de la cassure double brin. [118]

FIGURE 3.1 – **Schéma global du principe de la réparation de l'ADNsb par NHEJ ou par la RH à partir de la chromatide soeur**

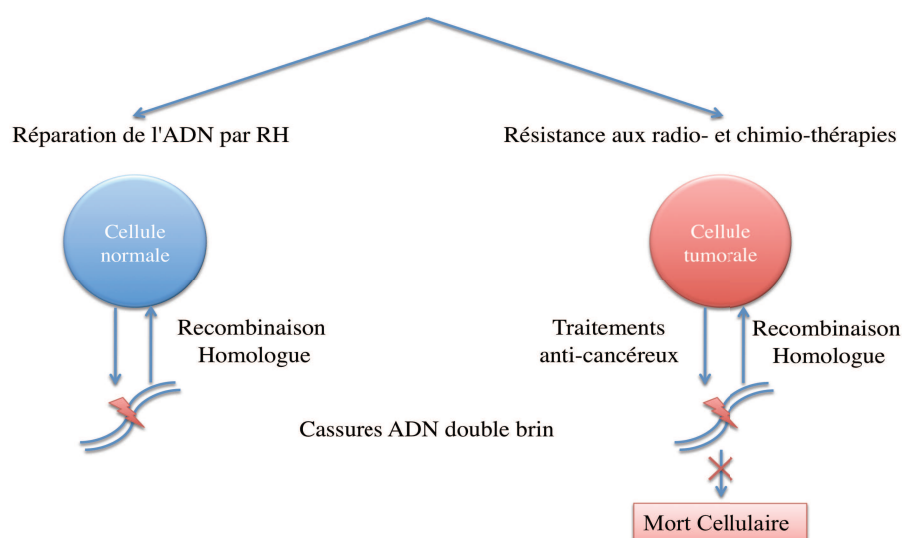


La recombinaison homologue se déroule en trois grandes étapes, la phase pré-synaptique, la phase synaptique et la phase post-synaptique. Que ce soit chez les Procaryotes ou chez les Eucaryotes, il existe une protéine, nommée respectivement RecA ou Rad51 (HsRad51 pour la protéine humaine), jouant un rôle central dans le maintien de chaque étape du processus de la RH. [119]

Une sur-activité de la protéine HsRad51 a été observée dans certains cas de cancer (en particulier le cancer du sein). Et, il a été constaté que la recombinaison homologue *via* l'activité de HsRad51 pouvait diminuer l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Dans la figure 3.2 est représentée l'impact de la RH sur la conservation de l'ADN. Dans le cas d'une cellule normale, si l'ADN se retrouve avec des DSB, la RH permettra de reconstruire la séquence et garantira le maintien même de la cellule normale. Dans le cas d'une cellule tumorale, on applique des traitements anti-cancéreux (radio- ou chimio-thérapies), on alors

visé à provoquer des DSB sur l'ADN pour conduire vers la mort cellulaire. Or, la RH a tendance à contrebalancer l'efficacité des traitements en maintenant en place l'ADN au sein de la cellule tumorale, ainsi, pour augmenter l'efficacité des traitements il devient nécessaire d'en augmenter la quantité. Afin d'assurer l'efficacité des traitements tout en diminuant la quantité injectée, il est intéressant de concevoir des inhibiteurs de la RH, et tout particulièrement l'activité de réparation de HsRad51.

FIGURE 3.2 – **Schéma global du principe de conservation du génome par la recombinaison homologue dans le cas d'une cellule normale et dans le cas d'une cellule tumorale**



Comme nous le verrons dans la section suivante, durant les différentes phases de la RH suite à une cassure double brin, la formation du nucléofilament de HsRad51 reste l'étape centrale. Ainsi, des inhibiteurs de la formation de ce filament protéique ont été mis en avant. Pour pouvoir effectuer une étude à l'identification d'inhibiteur de HsRad51 *via* un ADNsb fixé sur une surface, il est nécessaire d'étudier au préalable, la réponse de l'interaction sur la surface avec la protéine seule. Nous utiliserons un cristal de quartz d'or pour les mesures par QCM et une surface d'or pour les mesures par AFM. La surface sera modifiée selon la procédure décrite dans le chapitre 2. Nous étudierons la formation du filament nucléo-protéique dans différentes condi-

tions de réactions et enfin nous ferons une première étude en présence d'un inhibiteur peptidique.

3.1 La Recombinaison Homologue et HsRad51

3.1.1 La Recombinaison Homologue et la réparation des cassures double brin

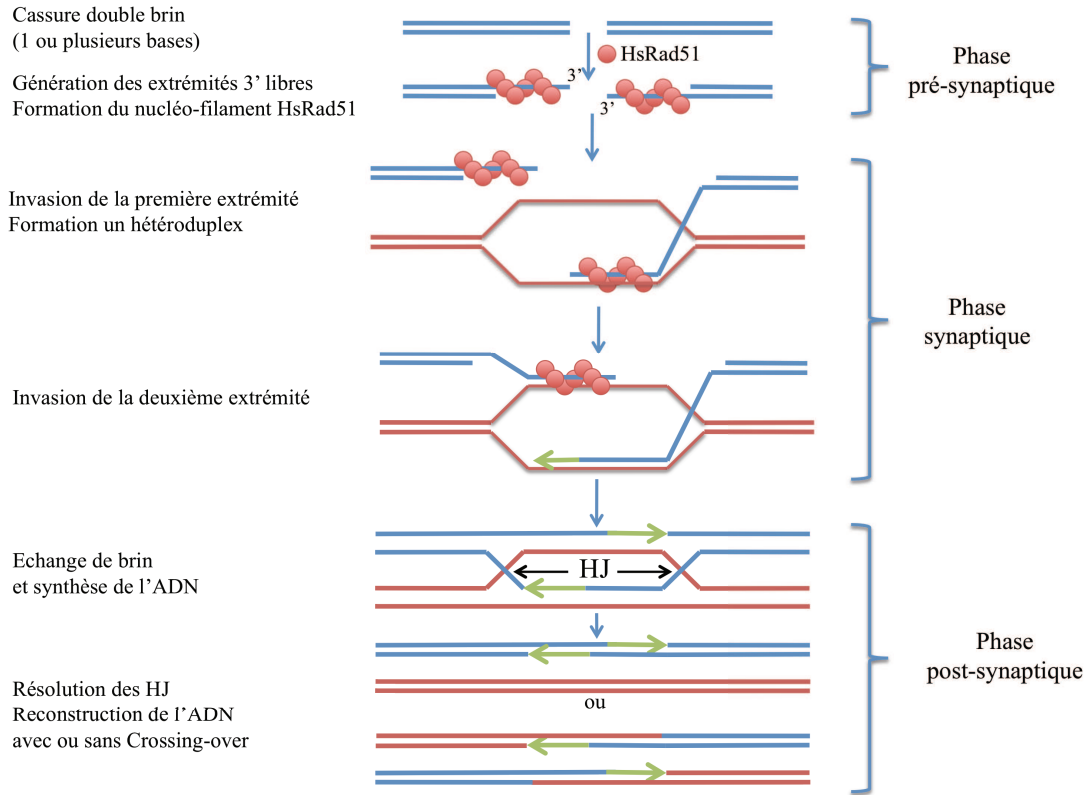
La recombinaison homologue (RH) est un processus génétique très conservé des bactéries à l'homme. Ainsi, le modèle le plus étudié dans la littérature est celui de la bactérie *Escherichia coli* où la protéine RecA tient le rôle central du mécanisme de la RH tel son homologue Eucaryote humain HsRad51. Ici, nous citerons uniquement la littérature liée à la protéine Eucaryote pour éviter les redondances et spécifier ainsi uniquement les propriétés de la version humaine ou analogue.

Suite à la cassure double brin de l'ADN qui peut être provoquée par de multiples facteurs, la machinerie de la recombinaison homologue s'engage alors pour reconstruire la perte d'une ou plusieurs bases de la séquence d'ADN. La protéine HsRad51 possède donc un rôle central dans le mécanisme de la RH, seulement celle-ci ne peut opérer toutes les étapes sans l'intervention de plusieurs autres partenaires protéiques. A travers les différentes étapes nous allons, en plus du mécanisme, préciser l'intervention de partenaires clés. Pour plus de clarté, nous nous limiterons à quelques exemples de protéines partenaires, en s'appuyant sur les travaux de Li *et al.* [118]

Phase pré-synaptique - Formation du filament nucléo-protéique HsRad51-ADNsb

Pour que la protéine HsRad51 puisse former un filament nucléo-protéique autour de l'ADN, il est nécessaire d'avoir un simple brin avec une extrémité 3'. Suite à la cassure double brin, une série de protéines interviennent pour former le simple brin. Parmi ces protéines nous retrouvons le complexe MNR (MRE11-RAD50-NSB1) [120] et l'intervention également de la protéine HsExo1, qui ont une activité de type exonucléase, ce qui permet de former un simple brin d'ADN et d'en stabiliser les extrémités 3'. S'ensuit la combinaison de protéine comme la RPA [121] qui est la cible de HsRad52 qui elle même réagit

FIGURE 3.3 – **Schéma décrivant les trois grandes étapes de la recombinaison homologue ainsi que les six étapes intermédiaires (HJ pour Holliday junction)**



avec HsRad51. Cette combinaison de protéine permet alors à la protéine HsRad51 d'atteindre le fragment d'ADNsb pour former un nucléo-filament qui servira de support à la RH et donc à la reconstruction de la partie flanquante de l'ADNdb.[122]

Phase synaptique - Appariement des ADN homologues et Synthèse de l'ADN

Une fois le filament nucléo-protéique formé autour de l'ADNsb, il y a une recherche d'homologie de la séquence à réparer dans la chromatide soeur. La protéine HsRad54 formerait un complexe de type HsRad54-HsRad51-ADNsb qui serait plus efficace pour l'échange de brins. Elle serait également utile pour

la recherche d'homologie, du fait de l'une des capacités de la protéine HsRad54 pour induire des changements topologiques de l'ADN tout en se déplaçant le long de celui-ci. Cela permettrait alors de stimuler l'interaction du filament nucléo-protéique de HsRad51 avec l'ADNdb possédant l'homologie de la séquence à réparer.[123] Une fois l'homologie trouvée, il y a invasion du double brin homologue par le complexe HsRad51-ADNsb (formation d'une triple hélice d'ADN) puis le deuxième brin se fixe à l'autre extrémité du brin homologue.

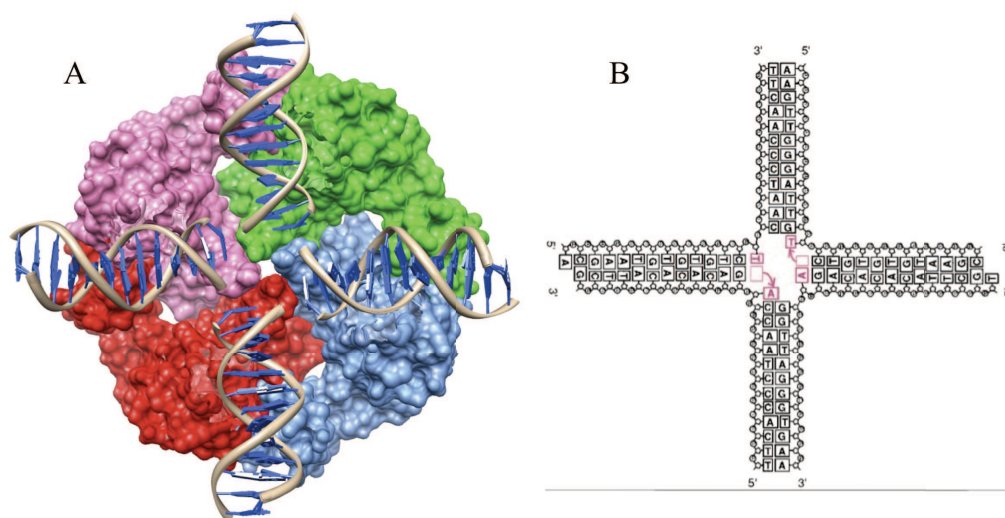
Une fois que les ADN simple brin et homologues sont hybridés, l'étape de reconstruction de l'ADN démarre. Pour ce faire, les extrémités 3' vont servir de point de départ pour générer la partie flanquante de l'ADN *via* des protéines de type ADN polymérase.

Phase post-synaptique - Résolution des structures intermédiaires

Pour finir, l'étape finale de la recombinaison homologue est la résolution des jonctions de Holliday. Cette étape permet de reformer deux double brins d'ADN *via* des protéines de résolution comme les résolvas ou les ADN hélicases couplées à des endonucléases. Les résolvas permettent au niveau du croisement des deux portions simple brin d'ADN de couper et de joindre les séquences entre elles. Cette résolution de structure peut conduire ou non à un crossing-over et donc à une recombinaison de l'information génétique. Donc soit le brin homologue est re-généré de façon identique soit il y a un croisement des séquences ADN entre celles réparées et celles provenant de la chromatide soeur. Les protéines intervenant dans la résolution des HJ (Holliday Junction) chez les Eucaryotes restent mal définies, cependant nous pouvons noter les protéines RuvA, RuvB et RuvC chez les Procaryotes, qui, elles, sont bien décrites dans la littérature et peuvent ainsi donner un bon exemple du fonctionnement de la résolution des HJ (cf. figure 3.4).[124]

Même si la recombinaison homologue fait intervenir une grande quantité de protéines, l'axe central de la RH est pilotée par la protéine HsRad51 (chez l'homme). En effet, HsRad51 permet, suite à la formation de son nucléo-filament, la recherche d'homologie et l'invasion de l'ADNdb homologue *via* la formation d'une triple hélice, seule la protéine HsRad51 permet ce mécanisme sans lequel la RH ne peut avoir lieu. Nous allons, dans la suite de ce chapitre, détailler les mécanismes de formation du filament nucléo-protéique autour de l'ADNsb.

FIGURE 3.4 – **Modélisation d'un tetramère de RuvA en liaison avec une jonction de Holliday**; A : modèle en trois dimensions, le tetramère est représenté en surface solide, à chaque couleur correspond un monomère RuvA ; B : schéma simplifié de la résolution de la HJ au niveau de l'ADN, d'après les travaux de Ariyoshi et al. (PDB : 1C7Y) [125]



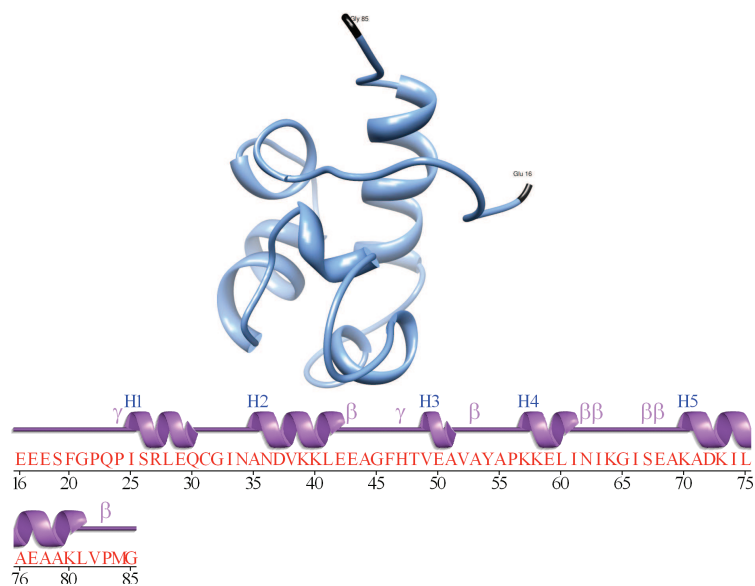
3.1.2 HsRad51 - Etude de la formation du nucléo-filament protéique autour de l'ADNsb

Avant de détailler la structure et le mécanisme de formation du filament nucléo-protéique, il est nécessaire de détailler la structure tertiaire de la protéine HsRad51 pour pouvoir l'appliquer à une forme multimérique quaternaire. Après avoir reporté la structure du filament, nous essayerons de discuter de sa cinétique de formation.

Structure de la protéine HsRad51

La protéine HsRad51 est constituée de 339 acides aminés pour une masse de 36,966 kDa. Seulement, pour le moment aucune structure complète n'a été obtenue. Nous nous fonderons cependant sur plusieurs études par RMN et par cristallographie d'éléments incomplets et sur la structure quasi complète d'un analogue de la protéine humaine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nous détaillons ici les différentes parties résolues. Actuellement, nous disposons dans la littérature du domaine terminal résolu par RMN et comprenant les

FIGURE 3.5 – **Domaine N-terminal de HsRad51 pour les résidus de 16 à 85 résolus par RMN.** Le domaine est représenté via un modèle en trois dimension au dessous duquel nous retrouvons la séquence avec la correspondance de la structure secondaire, H pour hélice, γ pour les coudes γ et β pour les coudes β d'après les travaux de Aihara et al. (PDB : 1B22) [126]

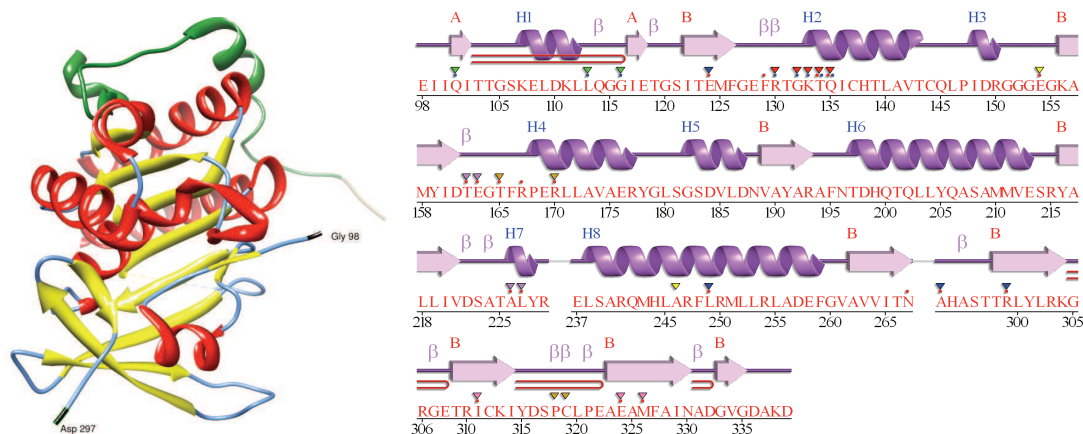


résidus 16 à 85 (figure 3.5). [126]

L'étude par cristallographie des rayons X a permis d'obtenir la structure du domaine central de la protéine (ou domaine de coeur) qui comprend les résidus 98 à 336. Ce domaine rend compte de l'activité ATPase de la protéine. En effet, celle-ci utilise l'ATP comme source d'énergie lors de la recherche d'homologie dans l'ADN homologue. Pour pouvoir être cristallographiée la protéine HsRad51 a été au préalable complexée avec les résidus 1519 à 1551 de la protéine BRCA2 qui intervient également lors de la recombinaison homologue et qui a servi de base pour définir l'inhibiteur BRCA4-28 utilisé à la fin de ce chapitre (cf. section 3.3).

On peut constater dans la partie résolue par cristallographie qu'il manque certaine parties du coeur de la protéine qui n'ont pu être résolues ou positionnées formellement. La première partie manquante est le domaine de liaison

FIGURE 3.6 – **Domaine central de la protéine HsRad51 complexé aux résidus 1519 à 1551 de la protéine BRCA2 (motif BRC4); représentation en trois dimension de la structure, en rouge les hélices α , en jaune les feuillets β comprenant les résidus 98 à 336 de la protéine et en vert le domaine correspondant aux résidus complexés de la protéine BRCA2; en parallèle est représenté la séquence cristallographiée de la protéine HsRad51 (résidu 98 à 336), H1, H2, ... dénombrent les hélices α , A et B dénombrent les feuillets β , le symbole β représente les coudes β , les épingle rouge représentent les épingle β , les carrés rouge ciblent les résidus en contact avec les résidus de BRCA2 et les carrés bleu ciblent les résidus en contact avec le métal, et les résidus grisés (230 à 236 et 268 à 292) correspondent aux boucles L1 et L2 non formellement positionnées, d'après les travaux de Pelligrini et al. (PDB : 1n0w) [127]**



entre la partie N-terminale et la partie centrale de la protéine. Ce linker est appelé PM (pour motif de polymérisation) qui participe à l'interaction entre deux monomères et est constitué chez HsRad51 des résidus 86 à 97. En effet, Pelligrini *et al.* ont évoqué l'existence de ce motif en se fondant sur l'interaction de la partie de la séquence BRC4 (1523 - GFHTASG - 1529) et le domaine situé entre le domaine N-terminal et central de la protéine, qui se trouve être très conservé d'une recombinaise à une autre. La conservation d'un tel domaine (cf. tableau 3.1) a permis de mettre en évidence son existence et qu'ils appartiennent à l'interaction protéine-protéine.

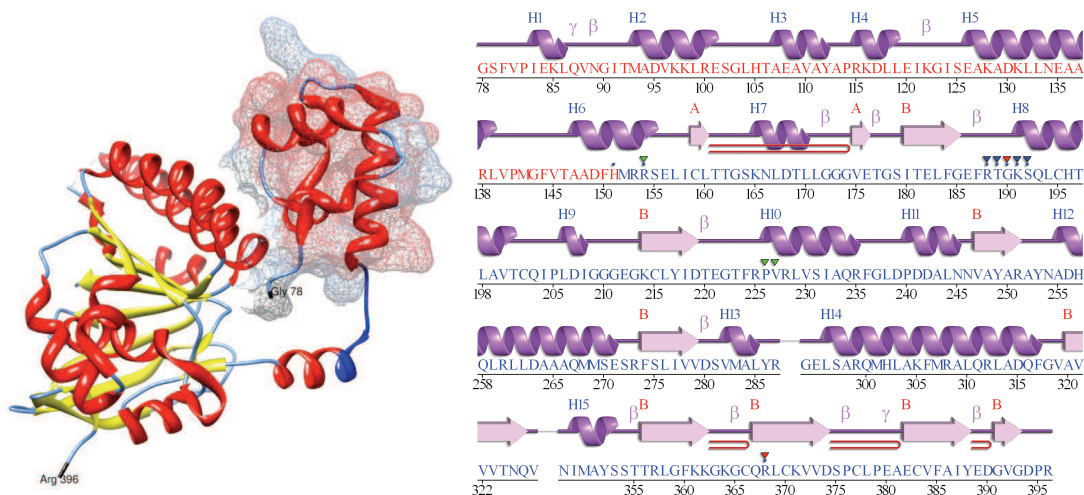
TABLE 3.1 – **Conservation des résidus (motif PM) impliqués dans l'auto-association des recombinaases, les résidus hydrophobes supposés critiques dans l'interaction sont représentés en gras, d'après les travaux de Pelligrini et al. [127]**

Espèce	Motif PM
Rad51 <i>Homo sapiens</i>	85- G F T T A T E -91
Rad51 <i>Cricetulus griseus</i>	85- G F T T A T E -91
Rad51 <i>Xenopus laevis</i>	82- G F T T A T E -88
Rad51 <i>Drosophila melanogaster</i>	82- G F L S A R T -88
Rad51 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143- G F V T A A D -149
DMC1 <i>Homo sapiens</i>	85- G F L T A F E -91
BRC4 <i>Homo sapiens</i>	1523- G F H T A S G -1529

Plus récemment, en 2010, l'équipe de Chen *et al.* a pu obtenir par cristallographie des rayons X, la résolution quasi complète de la structure de la protéine Rad51 chez *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine utilisée est un mutant de l'espèce sauvage, le résidu histidine (H) 352 est remplacé par une tyrosine (Y), ce qui permet de rendre le filament nucléo-protéique résistant à la présence de sel et facilite ainsi sa cristallographie par rayon X. Ainsi, ont pu être résolus l'ensemble des domaines pour les résidus 78 à 396 de la protéine. Nous remarquons également chez HsRad51 que les motifs correspondants aux boucles L1 et L2 n'ont pu être positionnés de façon formelle. Cependant, cette résolution permet de bien rendre compte de la position du linker correspondant au motif PM (représenté en bleu dans la structure en trois dimensions de la figure 3.7) entre le domaine N-terminal et le domaine central de la protéine, et ainsi la position respective des domaines l'un par rapport à l'autre. [128]

Pour conclure sur la structure de la protéine de HsRad51, il a pu ainsi être déterminé que le motif PM, très conservé au sein des recombinaases, permet l'interaction HsRad51-HsRad51. Quand au domaine N-terminal, celui-ci est impliqué dans l'interaction avec l'ADN double brin (lors de la recherche d'homologie) par le domaine HhH (pour Helix-hairpin-Helix ou Hélice-coude-Hélice) *via* les hélices H4 et H5 de la figure 3.5. Quand au domaine central, celui-ci sert d'une part à la liaison avec l'ATP, et d'autre part il est lié à l'interaction avec l'ADN simple brin *via* les boucles L1 et L2.

FIGURE 3.7 – Cristallographie de la protéine Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* possédant une mutation tyrosine à la place de l'histidine 352 ; représentation en trois dimension de la structure, en rouge les hélices α , en jaune les feuillets β comprenant les résidus 78 à 396 de la protéine, en bleu le domaine correspondant au motif PM et en surface le domaine N-terminal ; en parallèle est représenté la séquence cristallographiée de la protéine HsRad51 (résidu 98 à 336), H1, H2, ... dénombrent les hélices α , A et B dénombrent les feuillets β , le symbole β représente les coudes β , les épingles rouges représentent les épingles β , les carrés bleu ciblent les résidus en contact avec le métal, les résidus indiqués en rouge correspondent au domaine N-terminal et les résidus indiqués en bleu correspondent aux domaine central de la protéine, et les résidus grisés (288 à 293 et 328 à 347) correspondent aux boucles L1 et L2 non formellement positionnées, d'après les travaux de Chen et al. (PDB : 3LDA) [128]



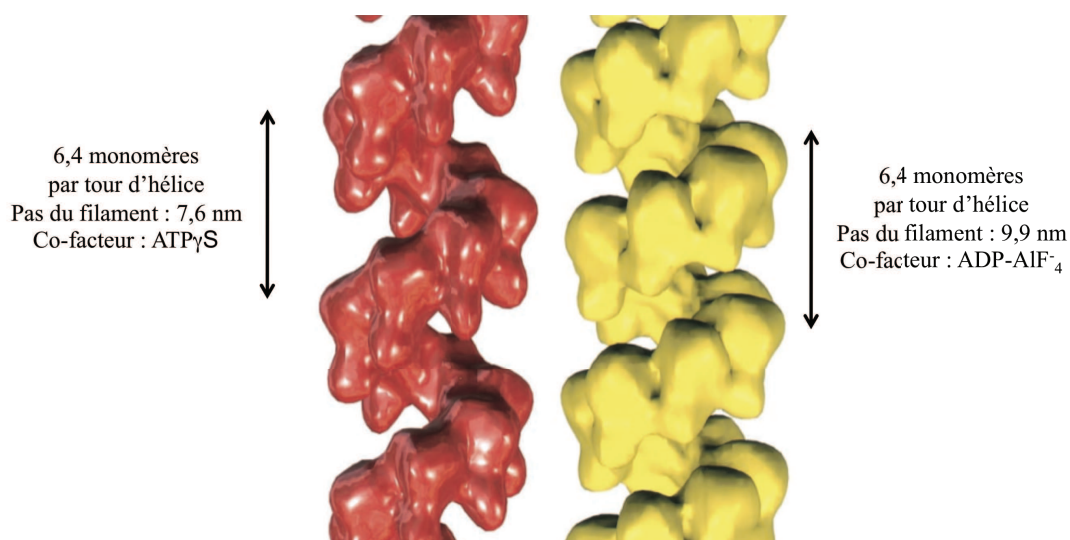
Structure et agencement du filament nucléo-protéique

Après avoir décrit les différents domaines de la protéine HsRad51, nous pouvons voir comment celle-ci s'organise dans l'espace pour former un filament nucléo-protéique. Le mécanisme aujourd'hui établi commence par la formation d'un premier complexe entre un monomère (ou multimère) de HsRad51 et l'ADNsb. Ce premier complexe est appelé nucleus, celui-ci sert de point de départ pour la formation du nucléo-filament *via* l'auto-association de la protéine sur un précédent complexe HsRad51-ADNsb. La première étape fait donc intervenir principalement les domaines de liaison de la protéine à l'ADNsb

(boucles L1 et L2). La deuxième étape est une combinaison entre l'interaction des motifs PM de deux protéines et de nouvelles liaisons avec l'ADNsb. La conformation adoptée alors par le filament nucléo-protéique peut être de différentes formes (étiré, comprimé ou encore en anneaux). Toutefois il semblerait que la forme étirée soit privilégiée pour la phase d'échange de brins. De plus, la plus grande partie des études faites à travers la littérature s'accordent sur la formation d'un filament nucléo-protéique selon le sens 3'-5' de l'ADN.

Des études effectuées par microscopie électronique et par cristallographie ont permis de mettre en évidence une structure hélicoïdale et l'agencement du filament nucléo-protéique. Il a ainsi été possible de mesurer le pas du filament de HsRad51 en présence de différents co-facteurs et de différents sels. Nous retrouvons par exemple un pas de 10 nm en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contre 7,5 nm en son absence. [129] La reconstruction d'un filament nucléo-protéique a également été proposée à partir d'images obtenues par microscopie électronique. Les filaments ainsi générés possèdent 6,4 monomères par tour d'hélice et le pas varie en fonction du co-facteur, pour l' $\text{ATP}\gamma\text{S}$ le pas est de 7,6 nm et pour l' ADP-AlF_4^- le pas est de 9,9 nm (cf. figure 3.8). [130]

FIGURE 3.8 – Reconstruction de filament nucléo-protéique de HsRad51 effectué à partir d'images obtenues par microscopie électronique en présence de différents co-facteurs ($\text{ATP}\gamma\text{S}$ et ADP-AlF_4^-), d'après les travaux de Yu et al. [130]



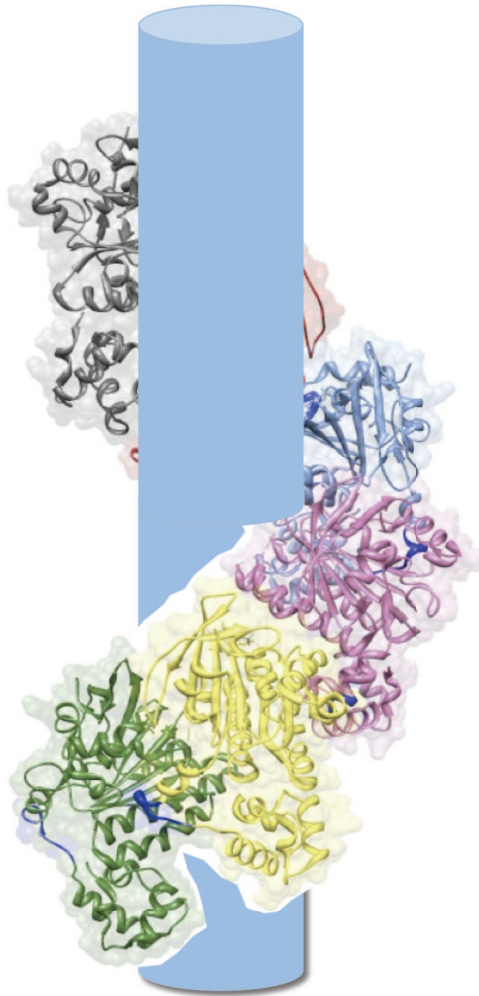
Nous pouvons également noter la cristallographie d'un filament nucléo-protéique pour un mutant de la protéine Rad51 (Rad51 1345T) de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce mutant possède une plus grande affinité pour l'ADNsb et cela sans altérer l'activité ATPase de la protéine. Le cristal du filament a été obtenu en présence d'ADNsb et d'ATP γ S et a montré un filament d'un peu plus de 6 monomères par tour d'hélice avec un pas d'environ 13 nm. A partir de cette cristallographie nous pouvons reconstruire la forme globale d'un tour d'hélice autour de l'ADNsb (cf. figure 3.9). [131]

Lors de la formation des filaments nucléo-protéiques, la présence de différents sels et co-facteurs a permis de mettre en évidence des phénomènes de régulation de la protéine. En effet, il a été montré par Shim *et al.* que l'affinité de la protéine pour l'ADNsb ou db serait la même en absence de sel à l'inverse en présence de sel (et du cation utilisé), la protéine HsRad51 posséderait une plus grande affinité pour l'ADNsb. [132]

La présence de co-facteurs influencerait également le mécanisme et la cinétique de formation du filament. En effet, même si les résultats montrent que la formation du filament peut s'effectuer sans co-facteurs, la présence de ceux-ci peut conditionner la cinétique et la formation même du filament. Ainsi, il a été montré que l'ATP et ses analogues tendaient à diminuer l'affinité de HsRad51 avec l'ADNsb contrairement à l'ADP qui tendrait à augmenter et à stabiliser l'interaction.[133, 134].

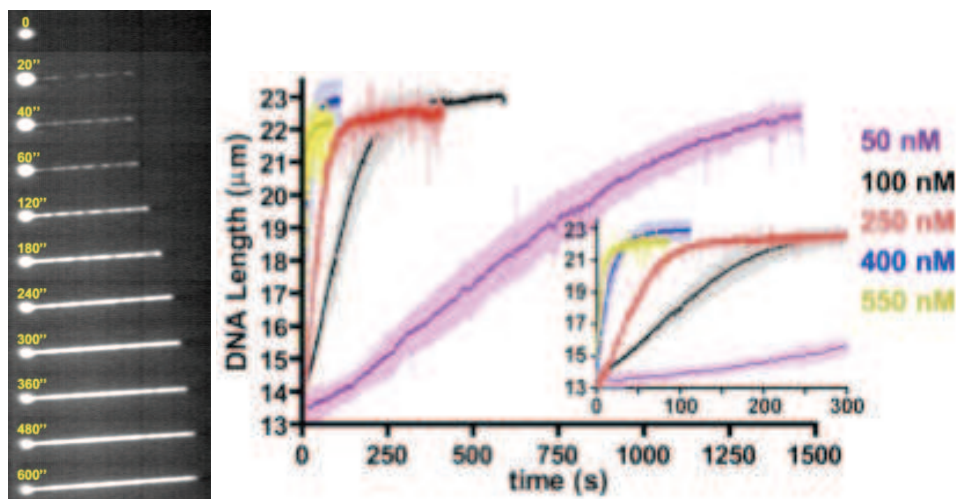
Il a été également montré dans une étude récente effectuée sur molécule unique que la concentration, en protéine pouvait avoir un impact direct sur la cinétique et donc la formation du filament nucléo-protéique.[135] Ainsi, à faible concentration il a été démontré une forte coopérativité de l'auto-association qui se traduit par une lente nucléation et une rapide élongation. Au contraire, dans le cas d'une forte concentration en protéine, il a été observé que la formation du filament se fait de façon moins coopérative et se traduit par une forte nucléation. Nous pouvons également retrouver les travaux de Heijden *et al.* [136] et de Hilario *et al.* [137] où des expériences similaires, avec l'apport d'autres techniques, ont pu mettre en avant ce même type de phénomènes et leurs variations, en fonction des conditions utilisées. Le travail de Hilario *et al.* permet notamment de visualiser en temps réel par fluorescence, la formation du complexe HsRad51-ADNdb tout au long de la réaction et ainsi de remonter à la

FIGURE 3.9 – **Reconstruction d'un filament nucléo-protéique à partir de la cristallographie d'un mutant de Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* (Rad51 1345T); Chaque monomère Rad51 est représenté avec une couleur différente, pour chaque monomère est représenté en bleu le motif PM, le cylindre central représente l'ADNsb, d'après les travaux de Conway et al. (PDB : 1SZP) [131]**



cinétique de nucléation et de l'auto-association de la protéine (cf. figure 3.10).

FIGURE 3.10 – *Suivi par fluorescence de la réaction d'auto-association de HsRad51 (100 nM) avec un ADN double brin, la protéine est marquée par un tag fluorescent (5(6)-carboxyfluorescein : FAM) sur l'extrémité du domaine N-terminal, la réaction se fait en présence de 2 mM de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ et de 1 mM d'ATP. La longueur du filament ainsi mesurée lors de l'auto-association est reportée en fonction du temps et pour différentes concentrations initiales en protéine Rad51^{FAM}, d'après les travaux de Heidjen et al. [136]*



3.2 Etude de la formation du complexe de HsRad51 avec l'ADN simple brin - QCM et AFM

L'objectif d'étudier la formation du complexe HsRad51/ADNsb est d'en comprendre le mécanisme cinétique à la surface du cristal de quartz pour pouvoir par la suite l'appliquer en présence d'un inhibiteur spécifique de la protéine et ainsi d'en déduire son mode d'action. Dans un premier temps, nous allons étudier l'association de HsRad51 avec un brin d'ADN simple brin d'environ 1700 nucléotides. Le brin est produit par PCR asymétrique, ce qui nous permet d'avoir presque exclusivement le simple brin de 1700 nucléotides (cf. annexes). Ensuite, le produit de PCR asymétrique est fixé sur la surface d'un cristal de quartz (recouvert d'or) modifié *via* la procédure décrite dans le chapitre précédent pour l'obtention d'une surface activée Au-Ar-SO₂Cl. Nous décrirons alors l'association de HsRad51 avec l'ADNsb en présence ou non de co-facteurs (ADP

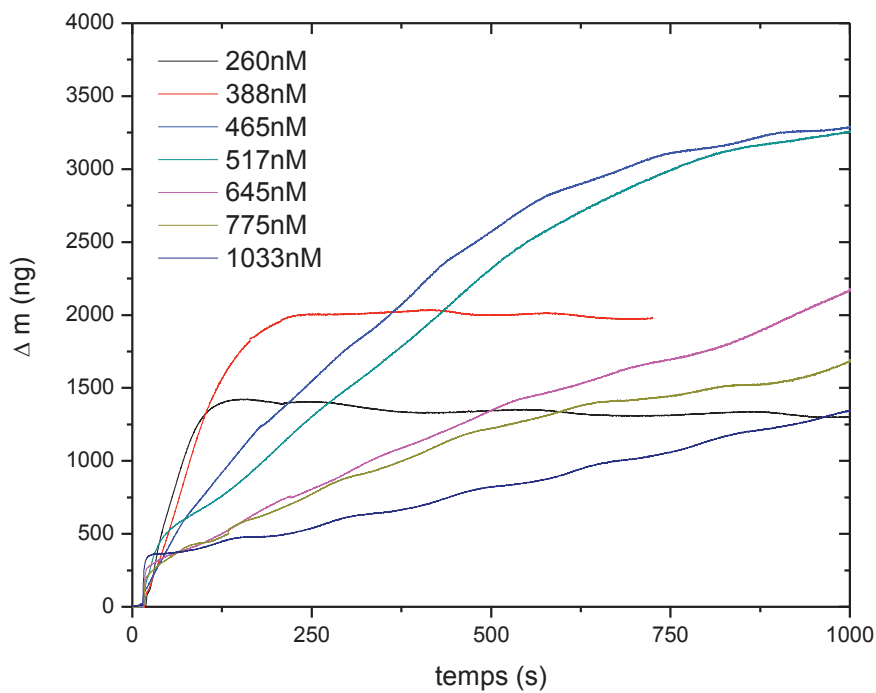
et ATP). Nous commencerons l'étude d'association sans co-facteur pour limiter l'apport d'agents extérieur à la cinétique.

3.2.1 Formation du complexe ADNsb/HsRad51 en absence de co-facteur

Afin de réaliser un complexe ADNsb/HsRad51, nous ajoutons différentes concentrations de protéine à la surface modifiée portant le simple brin d'ADN. Pour permettre la reproduction des cinétiques, à la fin de chacune d'entre elles, nous opérons un lavage de la surface en utilisant du SDS en très faible quantité. Le SDS a pour propriété d'inverser la polarité du système et de se placer entre l'ADN et le complexe protéique. Le complexe HsRad51 avec l'ADNsb étant de nature non-covalent, lorsque le SDS se retrouve entre les deux parties, il y a alors dissociation du complexe avec l'ADN. Pour vérifier que nous retirons toutes les protéines fixées à l'ADNsb, nous enregistrons entre chaque cinétique, un suivi par QCM de la dissociation *via* le SDS et nous comparons la masse globale prise et perdue. Le SDS pouvant endommager l'ADN, nous nous limitons à une dizaine de cinétique sur la même surface et cela avec de très faibles quantités de SDS (5 μ L d'une solution à 10% en SDS dans 600 μ L de solution tampon).

Nous injectons alors différentes concentrations en HsRad51 (de 260 à 1033 nM), pour chacune d'entre elles, nous enregistrons un suivi de la masse par la QCM (cf. figure 3.11). Nous remarquons dans la figure 3.11 différentes évolutions de courbes en fonction de la concentration. Pour les deux premières concentrations (260 et 388 nM), nous constatons un suivi cinétique similaire avec principalement une augmentation de la variation de la masse sur la surface. Cependant, nous constatons, pour les concentrations suivantes, l'augmentation d'un premier phénomène se passant durant les cinquante premières secondes. Suite à ce premier phénomène, nous observons une prise de masse constante dont la pente de la courbe diminue avec l'augmentation de la concentration. La masse finale obtenue reste quasiment constante à partir de la concentration de 465 nM, nous pouvons alors considérer que nous avons atteint dans ce cas la saturation en protéine complexant l'ADNsb. Le fait que la pente de la courbe diminue avec l'augmentation de la concentration peut être attribué à un phénomène d'inhibition lié à une sur-concentration en protéine. Pour pouvoir discuter du mécanisme, nous pouvons considérer, en

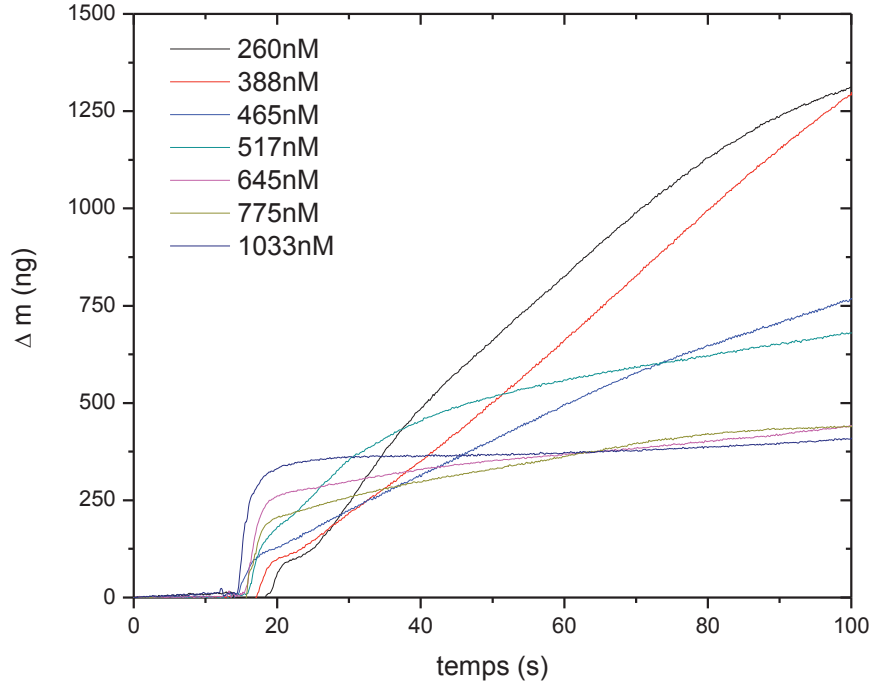
FIGURE 3.11 – **Suivi cinétique de la variation de la masse suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (260 - 1033 nM)**



appui avec la littérature, que le mécanisme d'association de la protéine avec l'ADNsb s'effectue en deux temps. Le premier consiste en la nucléation de la protéine sur l'ADNsb, qui permet d'amorcer la suite de la complexation de la protéine à l'ADNsb pour former le "collier" de protéines autour de l'ADNsb. Le deuxième temps consiste en l'auto-association de protéines entre-elles à partir de la protéine qui a formé le nucleus.

Ainsi, en zoomant sur la première partie de la courbe, nous pouvons obtenir des informations sur la nucléation de la protéine avec l'ADNsb (figure 3.12). On constate donc sur la figure 3.12 que la variation de la masse pouvant être attribuée en partie à la nucléation augmente avec la concentration. Seulement, nous pouvons également supposer qu'une partie de la masse enregistrée correspond également au début de la deuxième partie de la réaction (celle de l'auto-association). Ainsi, pour considérer uniquement le mécanisme de nucléation il faut travailler avec la vitesse initiale de la variation de la masse.

FIGURE 3.12 – **Suivi cinétique de la variation de la masse suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (260 - 1033 nM) - zoom sur la période de nucléation**



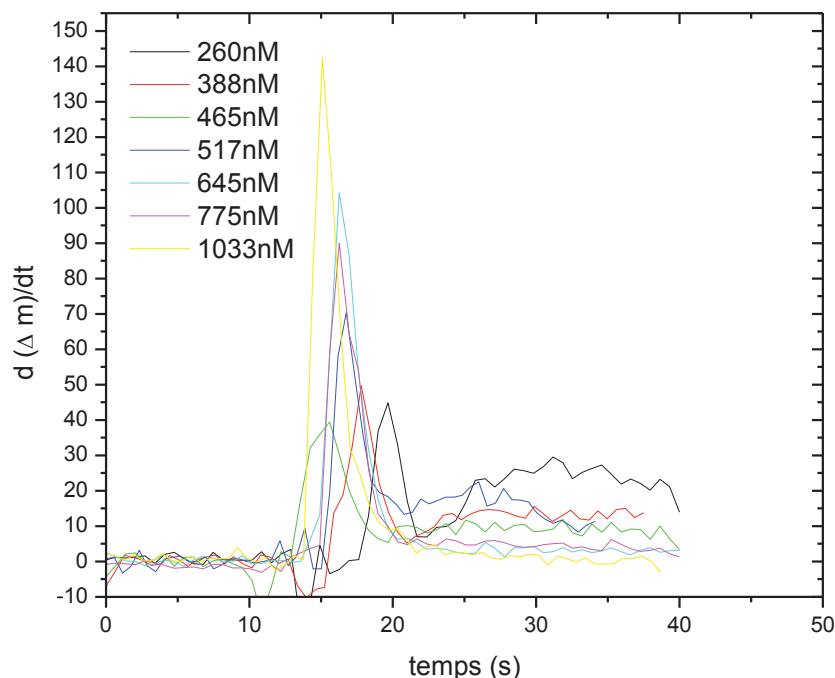
Pour ce faire, nous extrapolons la courbe avec soixante points dont nous faisons par la suite la dérivée que nous reportons en fonction du temps (figure 3.13). On peut voir à travers la figure 3.13 que la vitesse initiale correspond à la vitesse maximale enregistrée lors du suivi cinétique. Cette valeur maximale que nous attribuons à la vitesse initiale de la réaction peut être reportée en fonction de la concentration initiale en protéine. En effet, si nous détaillons le mécanisme réactionnel, nous pouvons supposer le schéma suivant :



Dans ce cas là, nous pouvons écrire l'équation de vitesse de nucléation de la protéine :

$$v = \frac{d[HsRad51/ADNsb]}{dt} = k_{nucl}[HsRad51][ADNsb] \quad (3.2)$$

FIGURE 3.13 – **Suivi cinétique de la variation de la vitesse de nucléation suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (260 - 1033 nM)**



A tout instant, les sites accessibles à la protéine sont en excès par rapport à la quantité de protéine, ce qui nous permet de simplifier l'équation de la vitesse initiale de nucléation de la façon suivante :

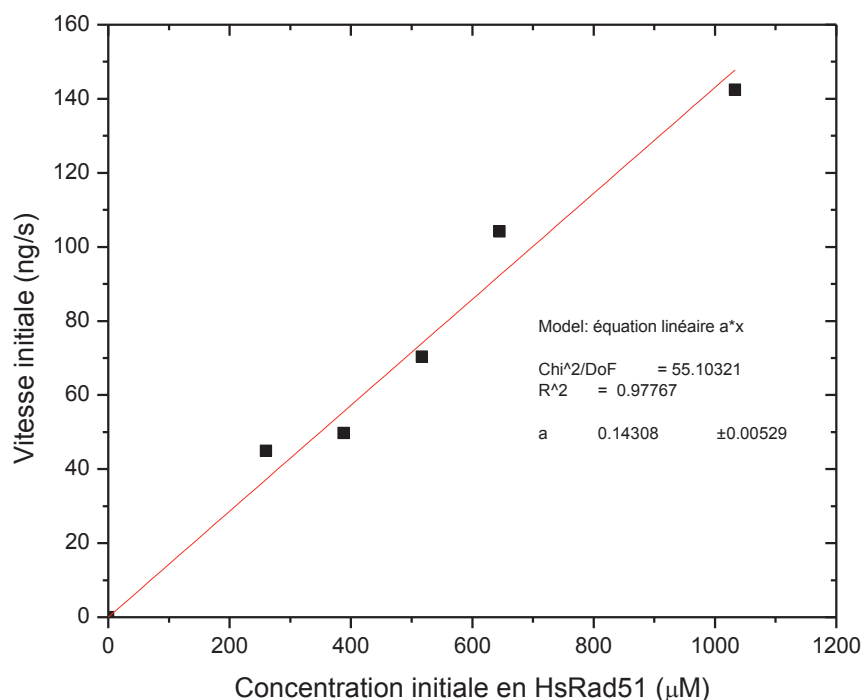
$$v_0 = k_{nucl}^{app}[HsRad51]_0 \quad (3.3)$$

Où $k_{nucl}^{app} = k_{nucl}[ADNsb]$ est la constante de vitesse apparente de nucléation.

Ainsi, en reportant la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en HsRad51, nous obtenons la figure 3.14. La régression linéaire avec une équation de type $y = ax$ sur la vitesse en fonction de la concentration initiale nous permet d'obtenir la constante de vitesse de nucléation apparente, $k_{nucl}^{app} = 0,14s^{-1}$. Du fait que la masse en ADNsb ne peut être estimée par l'équation de Sauerbrey (l'ADNsb n'étant pas assimilable à une sphère rigide), nous ne pourrions que comparer des constantes de vitesses apparentes dans la suite

des sections.

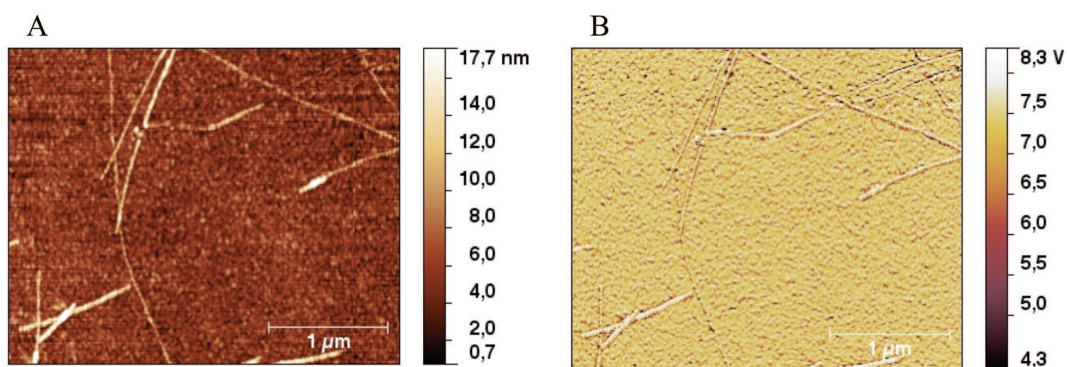
FIGURE 3.14 – **Report de la vitesse initiale de nucléation (ng/s) en fonction de la concentration initiale en protéine (nM) - régression linéaire sur l'ensemble des points**



De plus, pour la suite de la réaction, nous ne pouvons modéliser un mécanisme cinétique de l'auto-association de la protéine autour de l'ADNsb, du fait de son auto-inhibition à partir de 465 nM (on verra que ce n'est pas forcément le cas en présence de co-facteurs). En revanche, nous pouvons essayer de comprendre le phénomène qui engendre la diminution de la pente de la variation de la masse lorsque la concentration augmente. Pour ce faire, une visualisation par AFM s'avère indispensable. Ainsi, nous avons modifié des surfaces d'or possédant une faible rugosité (rms d'environ 1,2 nm) comme indiqué dans le chapitre 2. Sur ces surfaces, le même ADNsb y a été fixé auquel nous avons appliqué une solution de HsRad51. Ces surfaces ont ensuite été utilisées pour une visualisation des complexes par AFM. Pour se rapprocher de ce qui se passe à la surface du quartz, nous avons déposé 600 μL de tampon

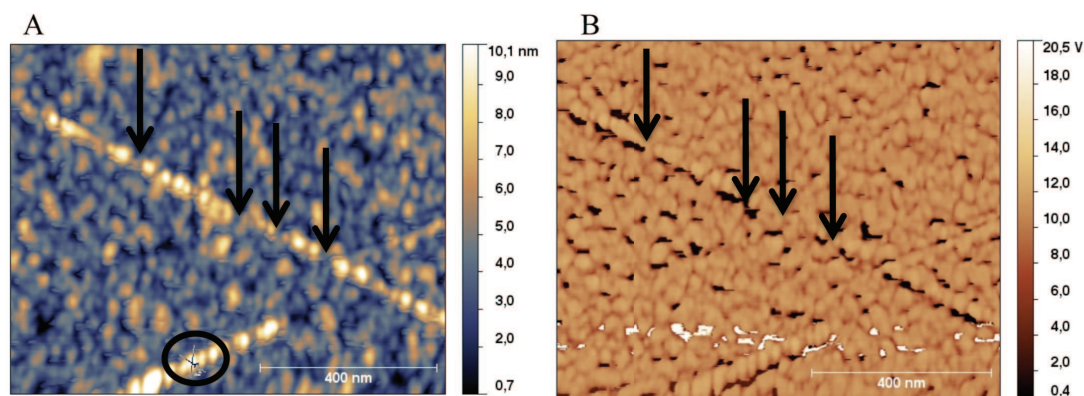
sur la surface de la plaque d'or. La surface de la plaque étant de taille beaucoup plus importante que celle du quartz nous avons injecté 30 μ L d'ADNsb, puis après rinçage avec de l'eau ultra-pure, nous avons appliqué une solution de HsRad51 de concentration de 465 nM. Cette concentration se trouve à la limite entre la saturation de l'ADNsb et une trop grande auto-inhibition.

FIGURE 3.15 – Image obtenue par microscopie à force atomique en mode non-contact d'une surface d'or modifiée par Ar-SO₂-ADNsb après réaction avec une solution de HsRad51 d'une concentration de 465 nM en absence de co-facteur ; A : image selon la topographie en z ; B : image selon le changement d'amplitude en z



Ainsi, nous obtenons les images AFM en mode non-contact de la figure 3.15. La figure 3.15 nous montre en topographie l'ADNsb recouvert par la protéine HsRad51. Cette attribution en topographie à la protéine peut être faite par la visualisation en phase de la surface. En effet, la phase permet de rendre compte des changements de friction/déflexion appliqués à la pointe de l'AFM. Ainsi, lorsque la pointe passe de la surface à une structure plus souple comme une protéine nous aurons une augmentation du potentiel et donc un changement dans la phase. De plus cette visualisation par la phase permet de voir certains détails sur la structure de l'objet observé dont la topographie ne rend pas forcément compte. De plus, dans le cas du complexe HsRad51/ADNsb celui-ci forme de longs filaments en hélice. Pour traduire la forme d'hélice en topographie, nous traçons la superposition de profils croisés selon la hauteur. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer un zoom sur une partie du filament formé par le complexe HsRad51/ADNsb (figure 3.16).

FIGURE 3.16 – *Image obtenue par Microscopie à Force Atomique en mode non-contact; A : image selon la topographie en z; B : image selon le changement d'amplitude (de friction) en z; Les flèches ciblent des défauts dans la continuité d'un filament protéique, la zone entourée servira pour tracer les profils croisés de la figure 3.17*

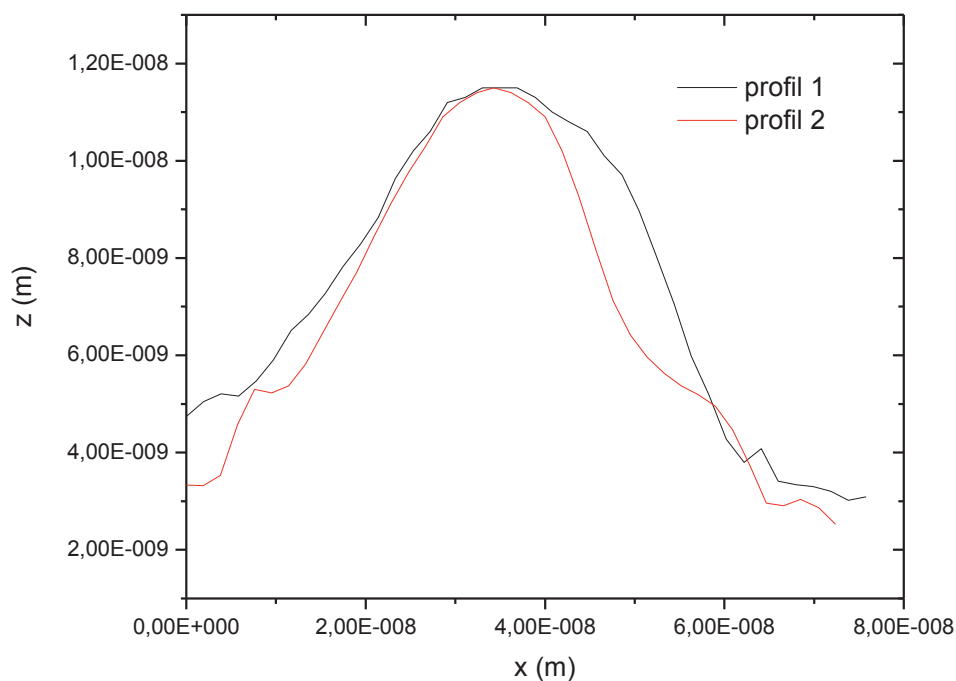


Dans la figure 3.16, on remarque dans le zoom effectué que l'image selon la phase (B) permet de bien rendre compte de la forme en hélice du filament de protéine (en particulier pour le filament se situant en bas de l'image). Nous pouvons également reporter les profils croisés tracés dans la figure 3.16-A (figure 3.17) qui nous permettent de rendre compte de la forme hélicoïdale. [138]

La dernière chose que nous pouvons noter, qui porte sur le mécanisme même de la formation du filament, est que le filament n'est pas formé de façon complète. En effet, lorsque nous regardons le filament en détail nous pouvons constater des "trous" entre les différentes zones de filaments. Nous savons, qu'après nucléation de la première protéine, que l'auto-association de la protéine pour former le filament se fait uniquement dans le sens 3'-5' de l'ADNsb. Nous pouvons alors raisonnablement supposer que l'existence de ces interstices (défauts) entre chaque zone vient du fait qu'il existe un grand nombre de nucléation et peu de filaments formés.

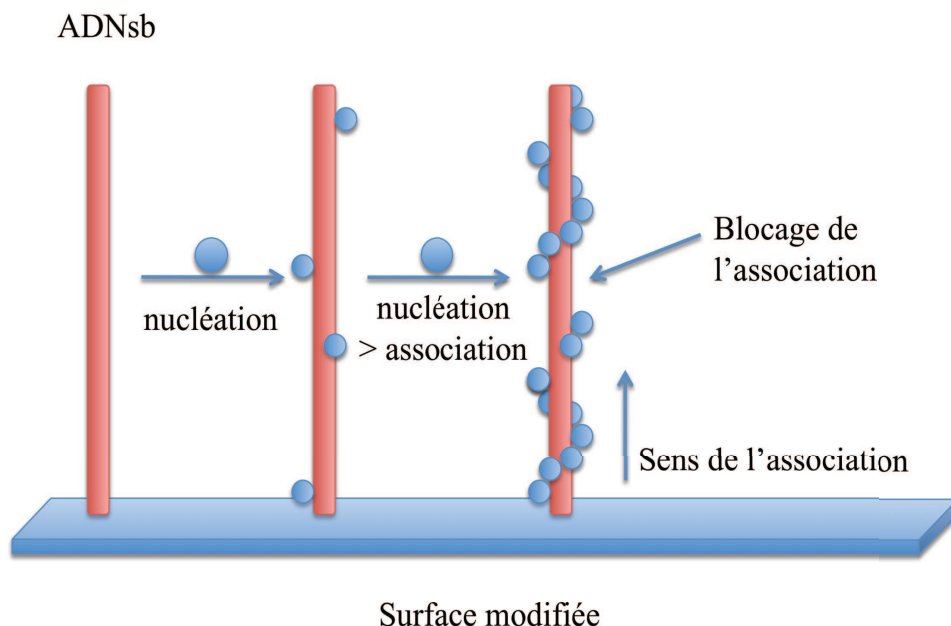
D'un point de vue cinétique, cela implique que la constante de vitesse de nucléation est supérieure à celle de l'auto-association. Ceci rejoint également l'étude que nous avons pu réalisée *via* la microbalance à cristal de quartz. Ces

FIGURE 3.17 – *Report des profils croisés marqués dans la figure 3.16-A selon la démonstration faite par Shi et al. [138]*



études nous permettent à conclure que l'auto-inhibition de l'association de la protéine avec l'augmentation de la concentration pourrait provenir d'une trop forte concentration en nucleus sur l'ADNsb ce qui bloquerait en partie l'auto-association par la suite de la protéine et engendrerait ainsi des filaments incomplets. De plus, nous avons également remarqué lors du suivi de la masse, que la première partie de la courbe associée à la nucléation augmentait en quantité avec la concentration ceci permet alors de corroborer notre hypothèse (cf. figure 3.18).

FIGURE 3.18 – **Schéma généralisant l'auto-association de HsRad51 en absence de co-facteur et la limitation par la nucléation**

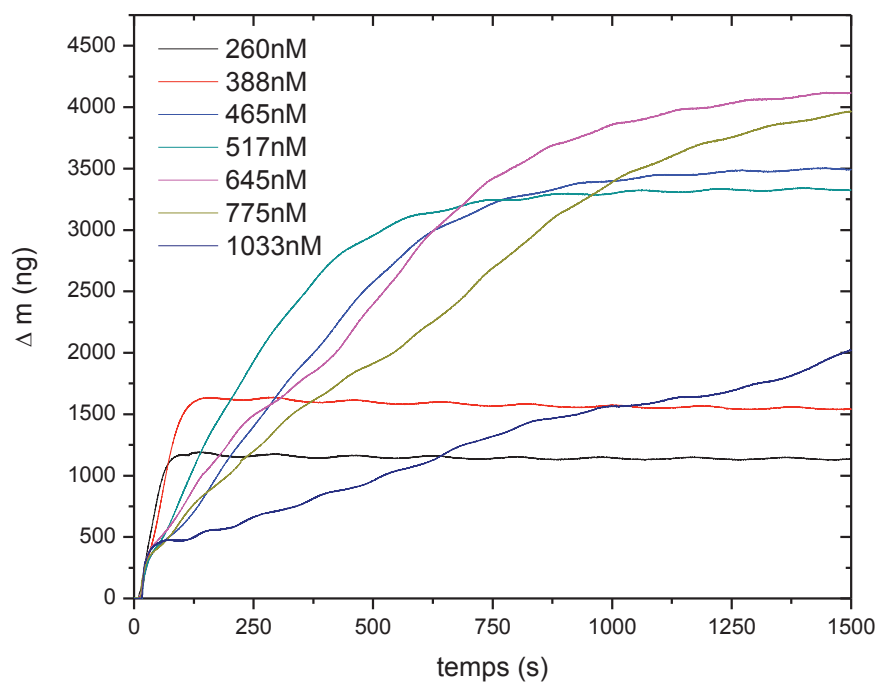


3.2.2 Formation du complexe ADNsb/HsRad51 en présence du co-facteur ADP

Formation du filament HsRad51/ADNsb en présence d'ADP en solution

Nous avons pu voir la cinétique d'accroche et une partie du mécanisme de la formation du complexe, nous allons à présent ajouter un co-facteur (l'ADP) à la réaction et en étudier son impact sur les cinétiques. La première série de suivis cinétiques *via* la microbalance à cristal de quartz se fera de façon similaire à celle réalisée lors de l'étude initiale. Pour cela, nous ajoutons aux 600 μL de tampon phosphate, l'équivalent en ADP pour obtenir une solution finale à 200 μM en ADP. A cette solution est ensuite additionnée différentes concentrations en protéine, avec rinçage entre chaque expérience par du SDS et de l'eau ultra-pure. Nous obtenons ainsi, les courbes de la figure 3.19. A travers cette série de courbes, nous constatons des profils cinétiques similaires à ceux obtenus lors de la formation du complexe en absence de co-facteur. Nous pouvons néanmoins remarquer quelques changements dans la variation

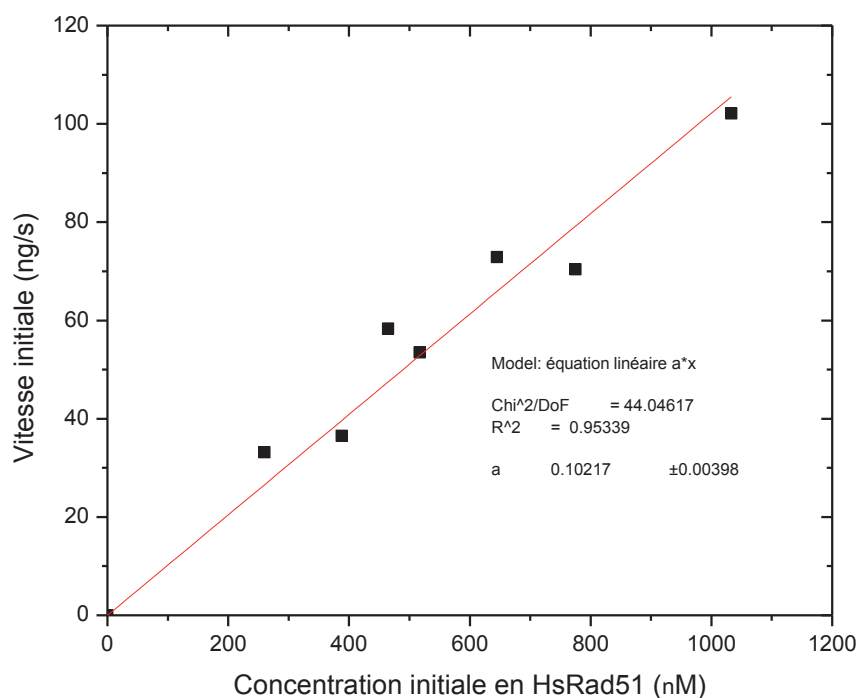
FIGURE 3.19 – **Suivi cinétique de la variation de la masse suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (260 - 1033 nM) dans un tampon phosphate contenant 200 μ M d'ADP**



globale de la masse. Pour des concentrations supérieures ou égales à 465 nM, nous constatons que la diminution de la pente de la courbe avec l'augmentation de la concentration est moins importante qu'en absence de co-facteur. Par exemple, entre la concentration de 465 nM et 517 nM, nous observons une augmentation de la pente pour la deuxième partie de la courbe. En outre, pour les concentrations supérieures, même si une diminution de la pente de la courbe est notée, la diminution de la pente reste moins importante qu'en absence de co-facteur. Ces observations nous laissent penser qu'en présence d'ADP dans le milieu, le filament de HsRad51 se forme à partir de moins de nucléi. Ceci revient à dire que soit la constante de vitesse de nucléation diminue par rapport à l'absence de co-facteur et se rapproche donc de la constante de vitesse d'auto-association. Soit la constante de vitesse d'auto-association devient plus importante que celle de nucléation. Dans les deux cas, cela revient à favoriser l'auto-association vis-à-vis de la nucléation. Nous pouvons donc es-

sayer de rendre compte de ce changement ou non de la constante de vitesse de nucléation en retraçant la courbe de la vitesse initiale de nucléation en fonction de la concentration initiale en protéine (figure 3.20). Nous constatons alors

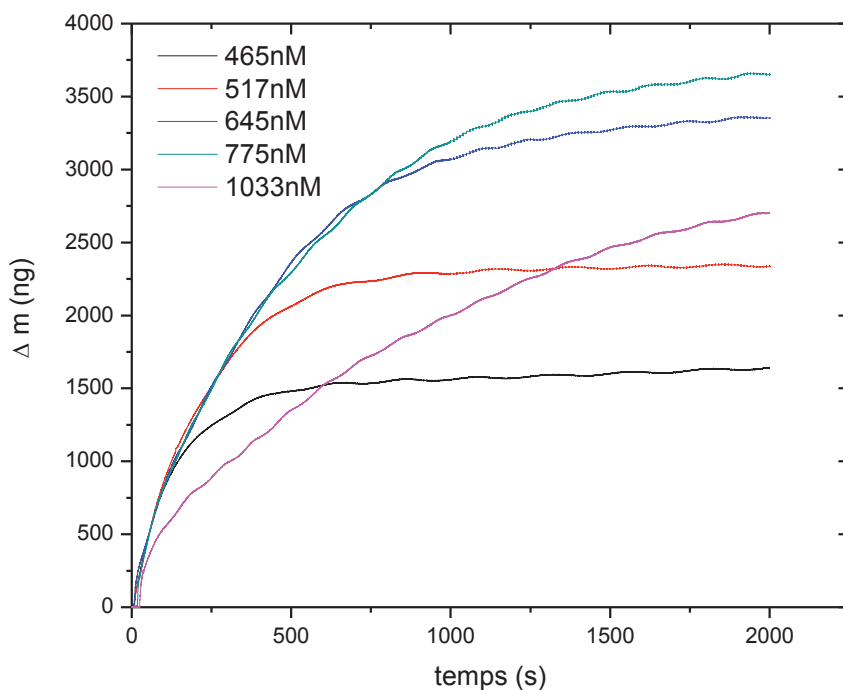
FIGURE 3.20 – **Report de la vitesse initiale de nucléation (ng/s) en fonction de la concentration initiale en protéine (nM) dans un tampon phosphate contenant 200 μM d'ADP - régression linéaire sur l'ensemble des points**



que l'évolution de la vitesse initiale de nucléation de la figure 3.20 est également linéaire. Nous pouvons, après régression linéaire, ressortir une constante de vitesse de nucléation apparente. Ainsi, en présence d'ADP dans la solution tampon où a lieu la réaction nous obtenons une constante de vitesse de nucléation apparente $k_{nucl}^{app}(ADP) = 0,10s^{-1}$ du même ordre de grandeur que celle obtenue en absence de co-facteur. Ce qui peut nous laisser penser que la présence d'ADP dans le milieu favorise la formation du filament et non des nuclei. Celui-ci agit sur la formation du filament en se fixant à la protéine HsRad51 pour permettre une meilleure orientation dans la formation du filament.

Formation du filament HsRad51/ADNsb lorsque l'ADP est préalablement mélangé avec HsRad51

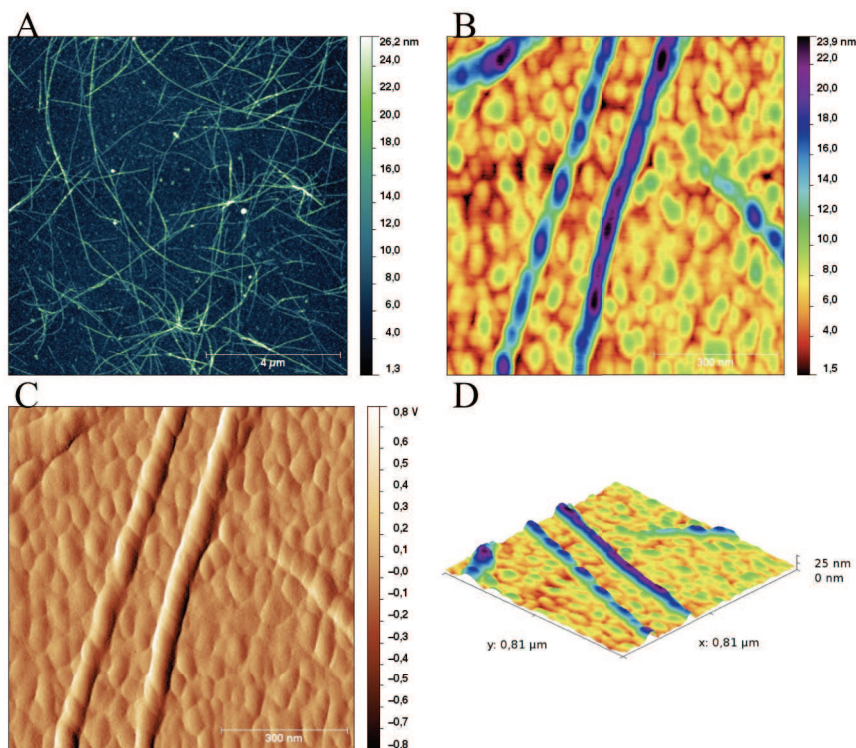
FIGURE 3.21 – *Suivi cinétique de la variation de la masse suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (465 - 1033 nM) mélangée au préalable avec de l'ADP dont la concentration finale en solution est de 200 μ M*



Pour démontrer cette hypothèse, nous avons au préalable mélangé l'ADP avec HsRad51, le mélange ADP/HsRad51 a été par la suite injecté dans une solution tampon phosphate pour réagir avec l'ADNsb fixé à la surface du cristal de quartz. Des suivis de la variation de la masse suite à l'injection ont été enregistrés pour différentes concentrations en protéine (figure 3.21). La quantité en ADP mélangée à la protéine dans la solution finale correspond à une concentration de 200 μ M.

On constate dans la figure 3.21 que toutes les courbes de cinétiques (sauf pour la concentration de 1033 nM pour laquelle nous nous trouvons en sur-concentration de protéines) suivent une progression plus linéaire que dans les

FIGURE 3.22 – **Visualisation par AFM d’une surface d’or modifiée par un simple brin d’ADN après application d’une solution de HsRad51 (775 nM) mélangée au préalable avec de l’ADP dont la concentration finale en solution est de 200 μ M**; **A : Image globale de la surface en topographie**; **B : Zoom en topographie**; **C : Rendu de la zone B en amplitude selon z**; **D : Rendu en 3 dimensions selon la topographie B**

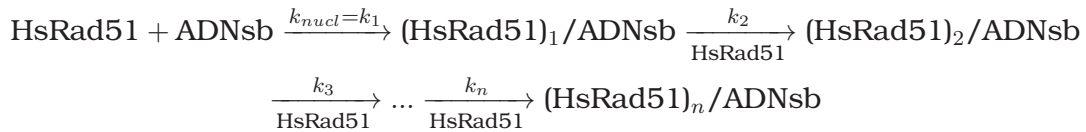


cas précédents et cela en une seule phase. Ceci nous montre que le fait de mélanger préalablement l’ADP à la protéine permet d’avoir toutes les protéines complexées à l’ADP. Nous pouvons supposer que la réaction de fixation de l’ADP à HsRad51 est plus lente que la fixation de HsRad51 à l’ADN. De plus, nous constatons que pour la concentration de 775 nM nous arrivons à saturation de l’ADNsb et qu’il y a alors recouvrement total de l’ADNsb. Pour vérifier que nous recouvrons complètement l’ADNsb par la protéine, nous avons modifié une surface d’or dans des conditions similaires pour obtenir l’équivalent en surface de ce que nous retrouvons pour la concentration de 775 nM dans le but de le visualiser par AFM (figure 3.22).

Contrairement à ce que nous avons pu obtenir en absence de co-facteur, lorsque l'ADP est mélangé au préalable avec la protéine, nous constatons dans les images AFM de la figure 3.22, des filaments beaucoup mieux définis. La figure 3.22-A nous indique une vue globale de la surface. Nous constatons que les filaments formés sont pour certains de très grande taille (supérieure au micron), ce qui suppose dans cette image que nous obtenons des structures qui se superposent. Nous pouvons néanmoins effectuer un zoom sur des parties non superposées pour observer en détail la structure du filament. Dans les figures 3.22-B, -C et -D (respectivement en topographie, en phase et en 3 dimensions selon la topographie), nous observons deux filaments dont la structure s'apparente à une forme hélicoïdale. De plus, nous pouvons constater que le filament possède une seule structure, sans interruption, ce qui suggère qu'il n'y a eu que très peu de nucleus pour former ces filaments. Dans le cas contraire, nous aurions observé des défauts au sein de la structure du filament.

3.2.3 Mise en place d'un modèle cinétique de la formation du filament HsRad51/ADNsb

Nous supposons donc d'un point de vue mécanistique, que la nucléation se fait de façon limitée par rapport à l'auto-association. Ainsi, si nous reprenons le mécanisme général de la formation du filament, nous pouvons écrire la suite réactionnelle suivante :



En supposant que les constantes de vitesses d'auto-association sont équivalentes entre elles tel que $\forall i \in [2; n] k_i = k_{assoc}$. Nous pouvons alors résumer la suite réactionnelle de la formation du filament de HsRad51 selon :



Cette suite réactionnelle est comparable à une cinétique de réactions successives, nous allons ainsi émettre des hypothèses afin de nous retrouver dans un cas simple d'étude, c'est-à-dire intégrable. Pour ce faire lorsque nous regardons la première partie de la réaction nous pouvons en écrire l'équation de

vitesse suivante :

$$v = -\frac{d[HsRad51]}{dt} = k_{nucl}[HsRad51][ADNsb] \quad (3.5)$$

En début de réaction, il y a formation de nuclei selon la vitesse précédente. En considérant que la quantité de sites d'ADNsb disponible au cours de la réaction est telle que la concentration [ADNsb] reste constante dans le temps nous pouvons réduire l'équation de la vitesse à un ordre 1 où $k_{nucl}^{app} = k_{nucl}[ADNsb]$:

$$v = -\frac{d[HsRad51]}{dt} = k_{nucl}^{app}[HsRad51] \quad (3.6)$$

Par intégration de cette équation, nous pouvons ainsi accéder à la variation de la concentration en HsRad51 suite à la formation du nucleus suivante :

$$[HsRad51] = [HsRad51]_0 e^{-k_{nucl}^{app} t} \quad (3.7)$$

Dans la suite de la réaction, à partir d'un nucleus, nous pourrions additionner la protéine pour former le filament de protéine. Ainsi, le complexe (HsRad51)₂ / ADNsb peut être considéré comme un intermédiaire réactionnel mais également comme un premier produit de la réaction. Par la suite, le nucleus servira de base pour former le filament nucléo-protéique. Cela implique, d'un point de vue cinétique, que la formation du nucleus déterminera la vitesse de la réaction. Nous pouvons alors considérer que le rapport entre la concentration en protéine en solution et le nucleus formé et alors qu'à tout moment de la réaction la disparition du complexe intermédiaire se fait selon un ordre 1 (rapport des concentrations nucleus / protéines). Nous pouvons alors résumer ceci par la réaction suivante où nous considérons $k_{ass}^{app} = k_{ass}[HsRad51]$:



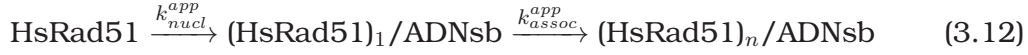
Nous pouvons alors décomposer les vitesses d'apparition et de disparition pour chaque intermédiaire réactionnel de la façon suivante $\forall i \in [2; n-1]$:

$$v_1 = k_{nucl}^{app}[HsRad51] - k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_1 / ADNsb] \quad (3.9)$$

$$v_i = k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_{i-1} / ADNsb] - k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_i / ADNsb] \quad (3.10)$$

$$v_n = k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_{n-1} / ADNsb] = \frac{d[P_{final}]}{dt} \quad (3.11)$$

où P_{final} est le produit obtenu à la fin de la réaction de formation du filament. Ce produit final correspond à dernière protéine HsRad51 venant se fixer à la fin du filament. Nous pouvons également considérer que la vitesse v_i est nulle et donc que tous les complexes $(HsRad51)_i/ADNsb$ sont équivalents. Nous les considérons également comme produits de la réaction. Nous pouvons alors réduire le schéma réactionnel de la façon suivante :



Il devient alors possible d'intégrer les différentes équations de vitesse et ainsi obtenir les équations de variations de concentrations des différents composés (réactif de départ, intermédiaire réactionnel et produit final). L'équation intégrée de la variation de la concentration en réactif de départ avait déjà été obtenue dans l'équation 3.7. L'équation d'apparition globale de l'intermédiaire réactionnel $((HsRad51)_1/ADNsb)$ est donnée par l'équation v_1 , qui après avoir remplacé la concentration en HsRad51 par son équation 3.7 conduit à :

$$v_1 = \frac{d[(HsRad51)_1/ADNsb]}{dt} \quad (3.13)$$

$$v_1 = k_{nucl}^{app}[HsRad51]_0 e^{-k_{nucl}^{app}t} - k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_1/ADNsb] \quad (3.14)$$

Après intégration selon la méthode de Lagrange, nous obtenons la variation de la concentration en intermédiaire réactionnel (nucleus) :

$$[(HsRad51)_1/ADNsb] = [HsRad51]_0 \frac{k_{nucl}^{app}}{k_{assoc}^{app} - k_{nucl}^{app}} (e^{-k_{nucl}^{app}t} - e^{-k_{assoc}^{app}t}) \quad (3.15)$$

En portant alors cette valeur dans l'expression de la vitesse d'apparition du produit $(HsRad51)_n/ADNsb$, nous obtenons :

$$v_n = \frac{d[(HsRad51)_n/ADNsb]}{dt} \quad (3.16)$$

$$k_{assoc}^{app}[(HsRad51)_1/ADNsb] = [HsRad51]_0 \frac{k_{nucl}^{app} k_{assoc}^{app}}{k_{assoc}^{app} - k_{nucl}^{app}} (e^{-k_{nucl}^{app}t} - e^{-k_{assoc}^{app}t}) \quad (3.17)$$

Puis après intégration, nous obtenons la variation de la concentration en produit de la formation du filament à tout instant t :

$$[(HsRad51)_n/ADNsb] = \frac{[HsRad51]_0}{k_{assoc}^{app} - k_{nucl}^{app}} (k_{nucl}^{app} e^{-k_{assoc}^{app}t} - k_{assoc}^{app} e^{-k_{nucl}^{app}t} + 1) \quad (3.18)$$

Nous accédons ainsi aux différentes équations décrivant les variations de concentrations de chaque composé. Travaillant à volume constant, nous pouvons appliquer ces équations à la variation de masse enregistrée à la surface du cristal de quartz pendant le suivi de la réaction de formation du filament. Cependant, il faut tenir compte du fait que, sur le cristal de quartz, nous enregistrons la variation de masse de tous les événements et non pas uniquement du produit final. La variation de masse enregistrée est alors une combinaison linéaire de la variation de la concentration en intermédiaire réactionnel et en produit final :

$$\Delta m_{total} = \Delta m_{(HsRad51)_1/ADNsb} + \Delta m_{(HsRad51)_n/ADNsb} \quad (3.19)$$

En combinant alors les deux équations 3.15 et 3.18 nous obtenons l'équation de la variation de la masse globale :

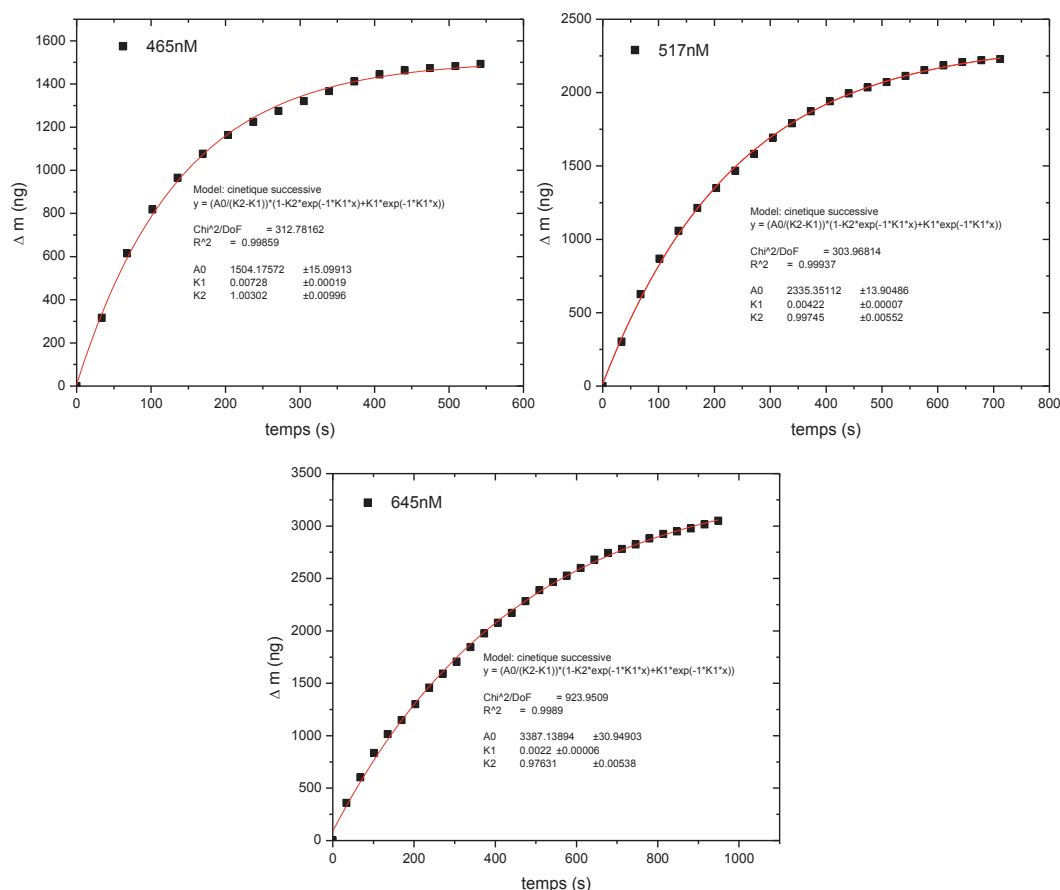
$$\Delta m_{total} = \frac{A_0}{k_{assoc}^{app} - k_{nucl}^{app}} (1 + (k_{nucl}^{app} - k_{assoc}^{app}) e^{-k_{nucl}^{app} t}) \quad (3.20)$$

Où A_0 correspond à la masse finale Δm_{∞} qui, si la réaction est totale, correspond à la masse initiale en protéine injectée.

Application du modèle cinétique dans le cas où le filament nucléo-protéique est formé à partir d'un mélange HsRad51 / ADP

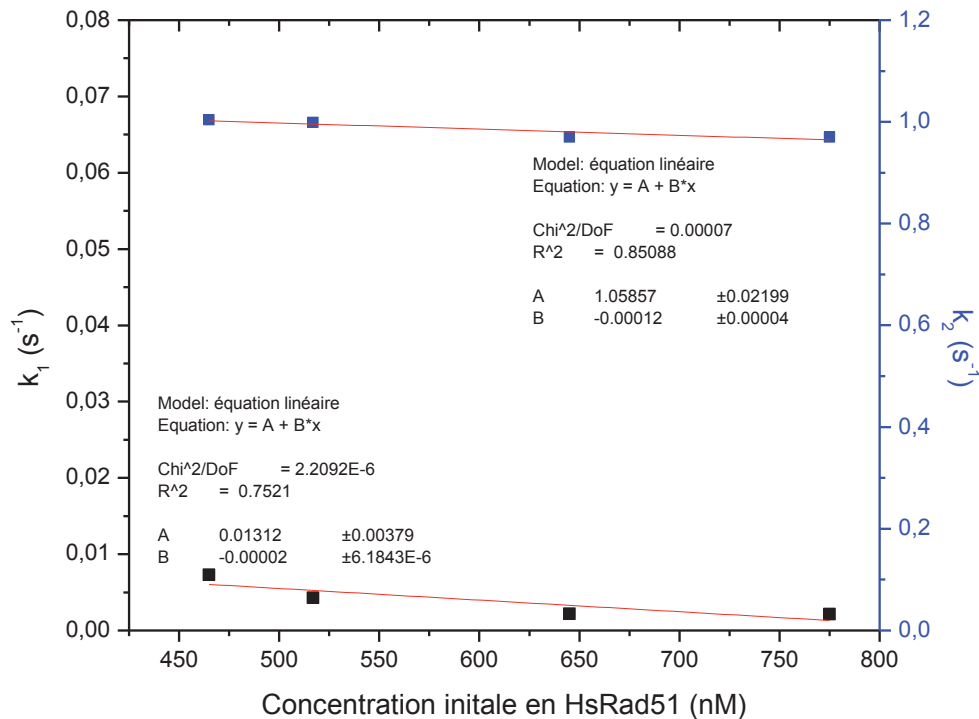
Il est ainsi possible de modéliser les événements biologiques de surface et de comparer les courbes théoriques avec les courbes expérimentales du suivi de la masse au cours de la réaction par l'équation 3.20 (figure 3.23). On constate dans la figure 3.23 que nous obtenons un très bon coefficient de régression r^2 supérieur à 0,99 sur l'ensemble des courbes expérimentales. Pour chacune des courbes, nous obtenons alors des valeurs de constantes de vitesses k_{nucl}^{app} et k_{assoc}^{app} . Ces valeurs sont reportées en fonction de leurs concentrations initiales en HsRad51 respectives (figure 3.24). Après régression linéaire sur les deux courbes de la figure 3.24 correspondant à chacune des constantes de vitesses. Nous obtenons dans les deux cas une droite avec une pente quasiment nulle (-0,0002 et -0,00003), ce qui montre bien que les constantes de vitesses de nucléation et d'auto-association sont indépendantes de la concentration initiale en protéine. Nous avons donc des valeurs de constantes de vitesses moyennes $k_{nucl}^{app} \approx 0,0040s^{-1}$ et $k_{assoc}^{app} \approx 0,988s^{-1}$. Nous pouvons voir à travers ces deux constantes que la cinétique globale de la réaction sera conditionnée

FIGURE 3.23 – **Application de l'équation 3.20 (tracés linéaires en rouge) aux différents suivi de la variation de la masse expérimentale (représentée par les carrés noirs) pour les concentrations en protéines initiales inférieures à la concentration de saturation (775 nM) du simple brin d'ADN**



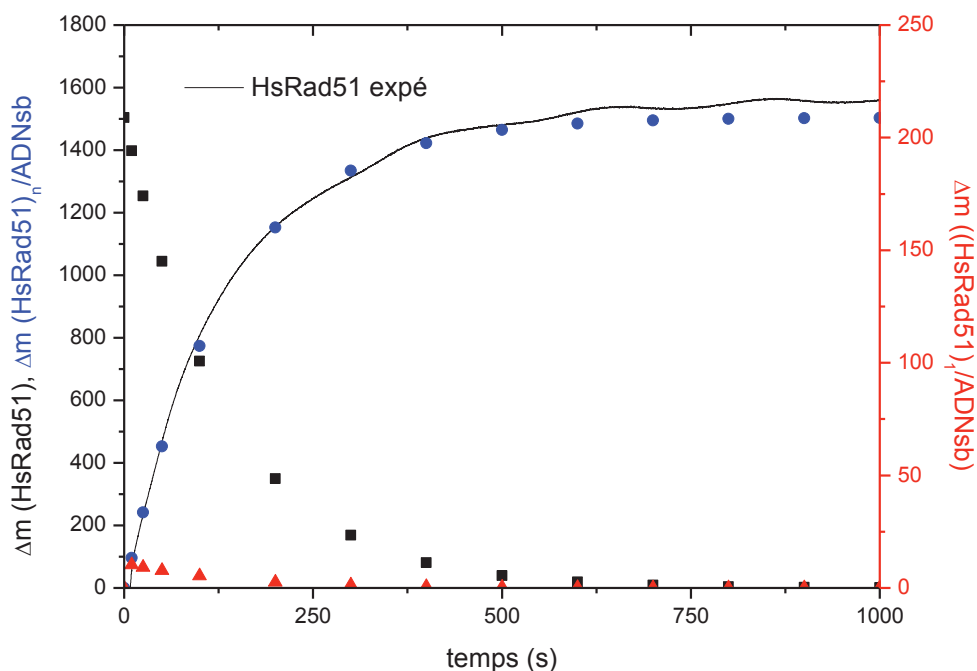
par la constante de vitesse de nucléation. Du fait d'un rapport entre les deux constantes de vitesses $k_{assoc}^{app}/k_{nucl}^{app} \approx 247$ relativement élevé, nous aurons alors principalement le rendu dans la variation de la masse de la formation du filament. Nous pouvons rendre compte de ce phénomène en simulant chaque variation équivalente en masse de chaque composé de la réaction en introduisant les différentes valeurs des constantes obtenues dans les équations 3.7, 3.15 et 3.18. Nous obtenons alors dans le cas de la concentration initiale en protéine de 465 nM la figure 3.25. On remarque dans la figure 3.25 que la

FIGURE 3.24 – **Report des constantes de vitesses $k_{nucl}^{app} = k_1$ et $k_{assoc}^{app} = k_2$ en fonction de la concentration en HsRad51 initiale - Régression linéaire sur les deux constantes de vitesses**



variation de la protéine en solution varie selon une exponentielle décroissante tout au long de la réaction. Pour la variation du nucleus nous observons une forme bi-exponentielle. Elle caractérise une apparition du complexe durant les tous premiers instants de la réaction selon une première exponentielle, puis cette forme du complexe disparaît progressivement selon une deuxième exponentielle plus lente que la première. Nous remarquons que cette forme du complexe ne représente qu'environ dix nanogrammes de la masse totale en complexe final. De plus, nous pouvons voir que la variation de la masse en complexe suite à l'auto-association suit une exponentielle croissante qui démarre de façon concomitante à l'apparition du nucleus.

FIGURE 3.25 – **Modélisation des variations de masse pour chaque constituant de la réaction à partir des équations 3.7, 3.15 et 3.18 pour une concentration initiale en HsRad51 de 465 nM mélangée au préalable avec de l'ADP pour une concentration finale en solution de 200 μ M**

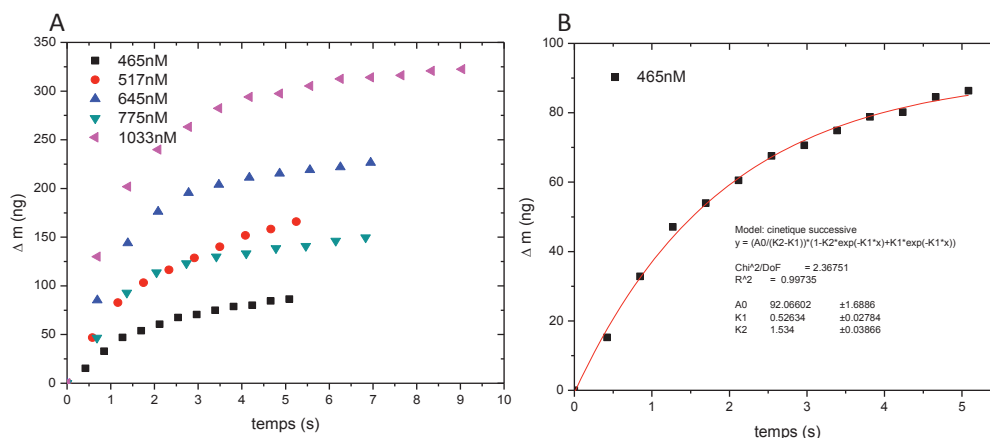


Comparaison du modèle de la formation du filament lorsque celui-ci est formé en absence de co-facteur

Dans le cas du mélange HsRad51 / ADP, les approches théoriques et expérimentales ont permis de déterminer des constantes de vitesses d'association et de dissociation. En absence de co-facteur nous avons remarqué qu'il y avait dans un premier temps une première prise de masse correspondant à un mélange de nucléation et d'auto-association. Nous avons pris alors la vitesse initiale de la réaction pour discuter uniquement de la nucléation. Or, nous pouvons supposer que dans la première partie de la courbe de la variation de la masse, correspondant à une courbe pseudo-exponentielle croissante, durant laquelle les deux phénomènes de formation du filament ont lieu. De plus, dans cette première partie de courbe, il est facile d'y appliquer les équations précédemment décrites, du fait que nous nous trouvons loin de la saturation du

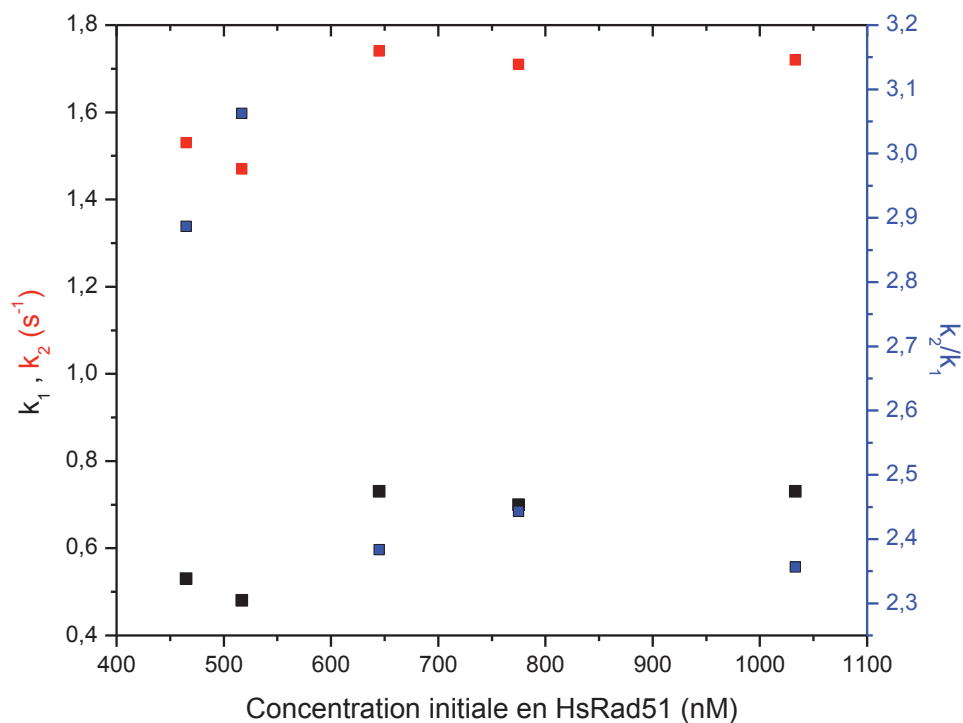
brin d'ADNsb. Pour ce faire nous avons isolé cette première partie de la courbe pour chaque concentration initiale (à partir de 465 nM) (cf. figure 3.26-A) et nous avons appliqué l'équation théorique 3.20 de la variation de la masse ((cf. figure 3.26-B pour la concentration initiale en HsRad51 de 465 nM). Cette mé-

FIGURE 3.26 – A : Séparation de la première partie des courbes de la figure 3.12 pour les concentrations initiales en HsRad51 465 - 1033 nM; B : Exemple d'application de l'équation théorique 3.20 de la variation de la masse pour la concentration initiale de 465 nM



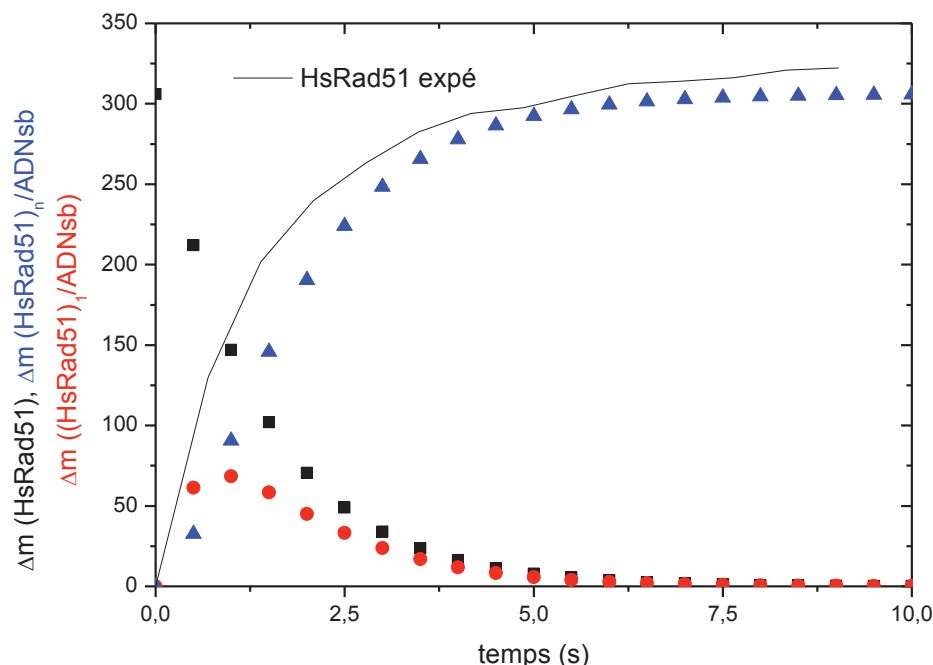
thode nous a permis d'obtenir les différentes valeurs de constantes de vitesses et leur rapport en fonction de la concentration initiale en HsRad51 ($k_{nucl}^{app} = k_1$ et $k_{ass}^{app} = k_2$). Cette étude est représentée dans la figure 3.27. On constate que les valeurs de la constante de vitesse d'auto-association se trouvent du même ordre de grandeur que celles obtenues pour l'ADP mélangé avec HsRad51 (valeur moyenne de $k_{assoc}^{app} \approx 1,6s^{-1}$). En revanche, si nous nous attachons aux valeurs de la constante cinétique de nucléation, nous constatons que celles-ci possèdent des valeurs théoriques bien plus importantes (valeur moyenne de $k_{nucl}^{app} \approx 0,6s^{-1}$ contre une valeur $\approx 0,0040s^{-1}$ dans le cas de l'ADP mélangé au préalable avec HsRad51). Nous observons que cette valeur moyenne de la constante de vitesse de nucléation reste du même ordre de grandeur que celle obtenue par la méthode de la vitesse initiale de la réaction. Ainsi, en faisant le rapport des deux constantes de vitesses nous obtenons une valeur moyenne du rapport $k_{assoc}^{app}/k_{nucl}^{app} \approx 2,7$ contrairement à un rapport ≈ 247 dans le cas de l'ADP mixé au préalable avec HsRad51. Cette importante différence dans le rapport

FIGURE 3.27 – **Report des constantes de vitesses** $k_{nucl}^{app} = k_1$ **et** $k_{assoc}^{app} = k_2$ **en fonction de la concentration en HsRad51 initiale, superposition du rapport des constantes de vitesses** $k_{assoc}^{app}/k_{nucl}^{app}$



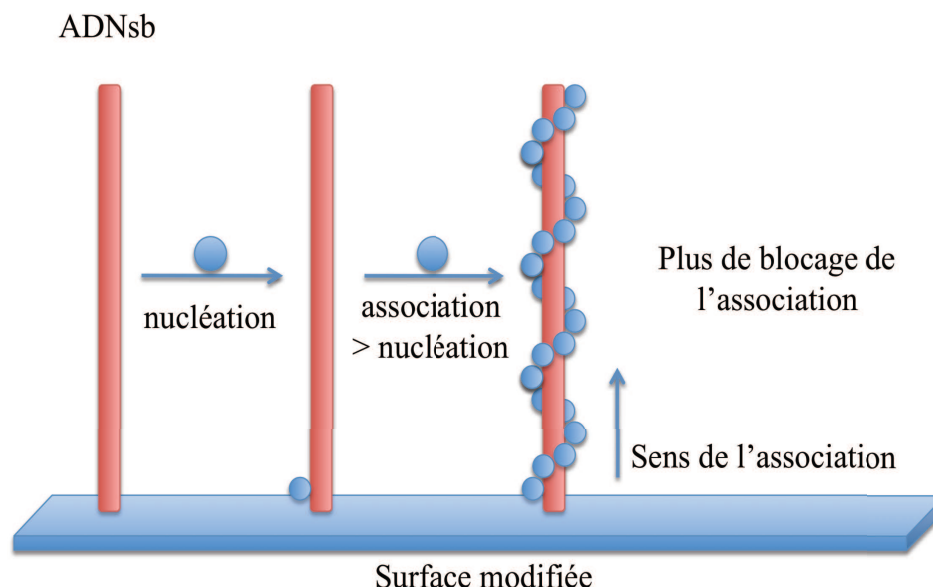
des constantes de cinétiques nous montre qu'en absence de co-facteur (rapport $\approx 2,7$) la vitesse de nucléation est environ 0,5 fois inférieure à la vitesse d'auto-association ce qui engendre une forte nucléation de la protéine. En revanche, dans le cas où la protéine est mélangé avec l'ADP le rapport des constantes de vitesses étant ≈ 247 . Ces résultats impliquent, que dès la formation d'un nucleus, il y a un début de formation du filament. Nous nous trouvons alors dans un système dit "coopératif". Pour compléter cette étude concernant le rapport entre les constantes de vitesses en absence de co-facteur nous représentons dans la figure 3.28 l'évolution massique des différents constituants de la réaction pour une concentration initiale de 465 nM. On peut voir à travers la figure 3.28 que dans les premiers instants, une quantité plus importante de nucleus est formée en comparaison avec la formation du filament. Ce qui influence directement la forme globale du filament. En effet, si nous formons

FIGURE 3.28 – **Modélisation des variations de masse pour chaque constituant de la réaction à partir des équations 3.7, 3.15 et 3.18 pour une concentration initiale en HsRad51 de 465 nM dans le cas sans co-facteur**



plusieurs nuclei sur un même brin d'ADNsb, nous bloquerons par la suite la formation du filament selon le schéma descriptif 3.18. De plus, nous pouvons constater que la partie exponentielle décroissante de la variation en nucleus possède une variation plus lente que dans le cas de l'ADP mixé à HsRad51. Cela caractérise une prolongation de la nucléation pendant la formation du filament, contrairement à ce qui avait pu être observé avec l'ADP mélangé à HsRad51. En effet, dans ce cas nous avons pu constater que cette partie de la courbe décroissait plus rapidement pour laisser place à l'auto-association et donc à la formation du filament de HsRad51. On peut alors à partir de ces différentes considérations retranscrire le schéma réactionnel lorsque l'ADP est mélangé avec HsRad51 (figure 3.29).

FIGURE 3.29 – **Schéma généralisant l'auto-association de HsRad51 mixé avec l'ADP, où la cinétique d'auto-association est supérieure à celle de nucléation**

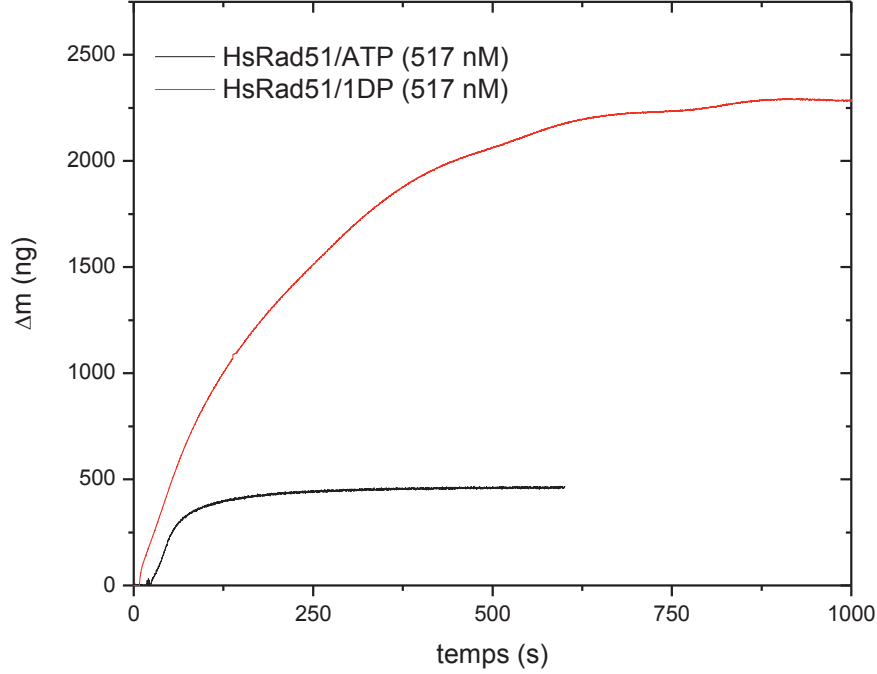


3.2.4 Formation du filament HsRad51/ADNsb en présence d'ATP

L'étude conduite en présence d'ATP a été menée de manière plus restreinte. Cependant, les premiers essais montrent la formation d'un filament de façon plus restreinte. En effet, si nous comparons pour deux concentrations identiques entre l'ADP et l'ATP mélangé au préalable avec HsRad51, nous observons une grande différence au niveau de la masse finale (cf. figure 3.30).

Si nous reprenons les quelques cinétiques effectuées dans le cas où l'ATP est mélangé avec HsRad51 au préalable de la réaction, nous obtenons les variations de la masse de la figure 3.31. On remarque ainsi, en comparant les variations de masse sur les figures 3.30 et 3.31, qu'en plus de ne pas atteindre la même masse finale, la forme générale de la courbe s'apparente plus à une sigmoïde qu'à une exponentielle croissante. Et dernièrement, nous observons que nous atteignons dès la concentration de 517 nM une saturation en protéine sur la surface, alors que nous pouvions nous attendre à une saturation du même ordre de grandeur que pour l'ADP. Cette limitation provient du mé-

FIGURE 3.30 – **Comparaison de la variation de la masse lors de l'injection de HsRad51 (517 nM) préalablement mélangé à de l'ATP ou à de l'ADP (concentration finale en solution de 200 μ M)**



canisme même engendré par la présence de l'ATP. En effet, comme l'ADP, l'ATP a la capacité de lier deux protéines par son intermédiaire, et également de s'hydrolyser pour donner de l'ADP. Dans notre système, la concentration en ATP est telle que le peu d'ADP formé lors de l'hydrolyse n'est pas suffisant pour prendre le pas sur l'ATP et permettre alors la formation complète d'un filament (et alors obtention d'une masse équivalente aux cinétiques précédentes). Nous pouvons alors supposer que dans notre cas, nous nous trouvons dans un équilibre thermodynamique imposé par l'hydrolyse de l'ATP. Nous parlons alors de régulation allostérique de la réaction enzymatique. Il est alors possible de supposer le mécanisme cinétique suivant où $\forall i \in [2; m]$:

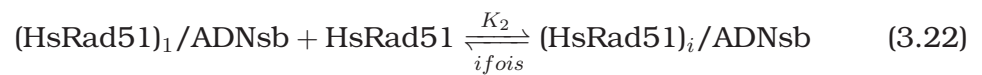
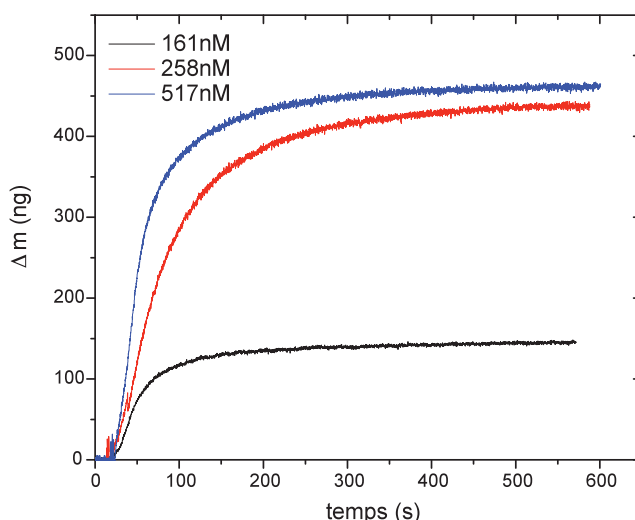


FIGURE 3.31 – **Suivi cinétique de la variation de la masse suite à l'injection de différentes concentrations en protéine HsRad51 (161 - 258 - 517 nM) mélangée au préalable avec l'ATP pour une concentration finale en solution de 200 μM**



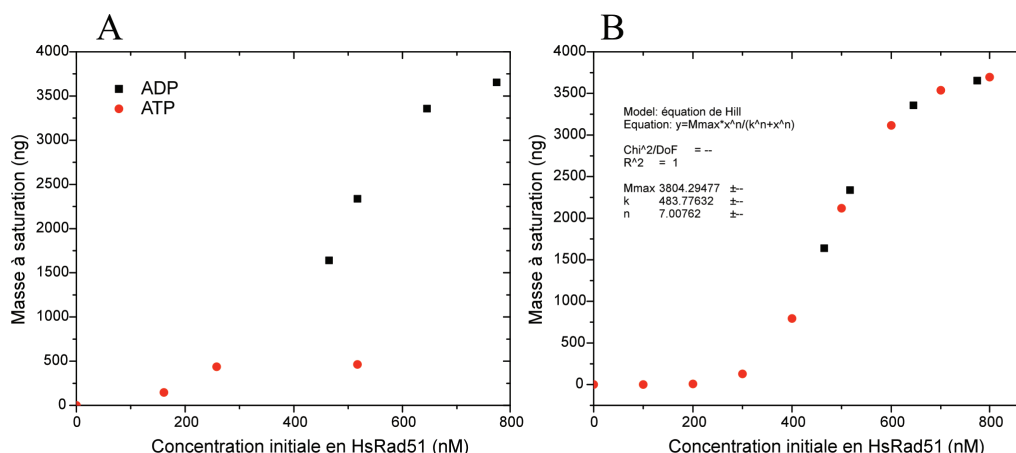
Dans ce cas nous ne considérons pas la présence de l'ATP, nous simplifions sa présence par l'existence de l'équilibre cinétique. Dans cette réaction K_1 représente la constante d'équilibre liée à la formation du nucleus et K_2 représente la constante d'équilibre de l'auto-association de la formation du filament en considérant que celle-ci est équivalente à chaque ajout d'une protéine jusqu'à l'obtention du produit final. Pour exploiter concrètement cette suite réactionnelle, il nous aurait fallu plus de valeurs et particulièrement dans les petites concentrations. En effet, nous pouvons envisager deux chemins pour exploiter ces résultats, dans le cas d'une réaction avec un équilibre thermodynamique. Dans les deux cas, nous utilisons l'équation de Hill (que nous réutiliserons pour le cas des transposases). L'équation de Hill est une version étendue de l'équation de Michaelis - Menten qui permet de rendre compte des phénomènes de coopérativité et d'allostérie lors d'une réaction enzymatique. Dans ce cas, nous pouvons utiliser comme variable, soit la masse finale, soit la vitesse initiale en fonction des conditions de la réaction. Dans le cas où la variable est la quantité finale de produit à un temps t_∞ (dans notre cas la masse), nous ne pouvons pas l'appliquer pour des concentrations initiales inférieures

à la concentration initiale permettant d'obtenir la saturation thermodynamique (dans notre cas nous pouvons voir que la concentration initiale de 465 nM doit être proche de l'équilibre thermodynamique maximal de la réaction pour cette concentration en ADNsb). Dans le cas de la vitesse initiale, il est nécessaire de travailler uniquement avec des vitesses initiales pour des concentrations en protéine telles que nous arrivons à la fin de la réaction à saturation du système. Le fait de prendre des concentrations telles que nous soyons à saturation à la fin de réaction, fait que nous n'influons pas sur la vitesse par un autre paramètre que la variation de la concentration en protéine initiale. Nous sommes donc soit dans des concentrations inférieures à l'obtention de la saturation de l'équilibre thermodynamique (dans ce cas nous utilisons la masse finale en complexe), soit nous plaçons les expériences pour avoir des concentrations initiales permettant d'atteindre le maximum de l'équilibre thermodynamique (dans ce cas nous utiliserons alors la vitesse initiale de la réaction). Nous verrons alors dans le cas des transposases dans le chapitre suivant que nous nous placerons de telle façon que nous puissions utiliser la vitesse initiale. Dans les cas actuels de HsRad51 que ce soit avec de l'ATP ou de l'ADP mélangés au préalable, nous nous trouvons quasiment toujours hors saturation. Ainsi, à titre de comparaison nous superposons dans la figure 3.32-A les masses finales obtenues pour un temps considéré comme le temps t_{∞} en fonction de la concentration initiale en HsRad51.

On remarque ainsi, dans la figure 3.32-A, que, dans le cas de l'ATP nous arrivons très rapidement à saturation (imposée par l'équilibre thermodynamique) avec une masse maximale inférieure à 500 ng. A l'inverse de l'ADP, nous atteignons des masses proches de 4000 ng et pour lesquelles la saturation arrive pour le double en concentration initiale. Dans le cas de l'ATP il nous manque trop de points dans les faibles concentrations pour pouvoir appliquer l'équation de Hill, du fait que nous nous trouvons dès la deuxième concentration à saturation du système. Par contre, dans le cas de l'ADP (même si quelques points supplémentaires pour de plus faibles concentrations auraient permis une meilleure analyse) étant dans une gamme de concentrations initiales inférieures à la concentration de saturation, nous pouvons appliquer l'équation de Hill qui est de la forme générale suivante :

$$Y = Y_{\infty} \frac{X^n}{K_{50}^n + X^n} \quad (3.23)$$

FIGURE 3.32 – **A : Variation de la masse finale (à t_{∞}) en fonction de la concentration initiale en protéine HsRad51 pour les cas ATP (rouge) et ADP (noire) mélangés au préalable ; B : Application de l'équation de Hill (rouge) sur les masses finales pour le cas de l'ADP (noire)**

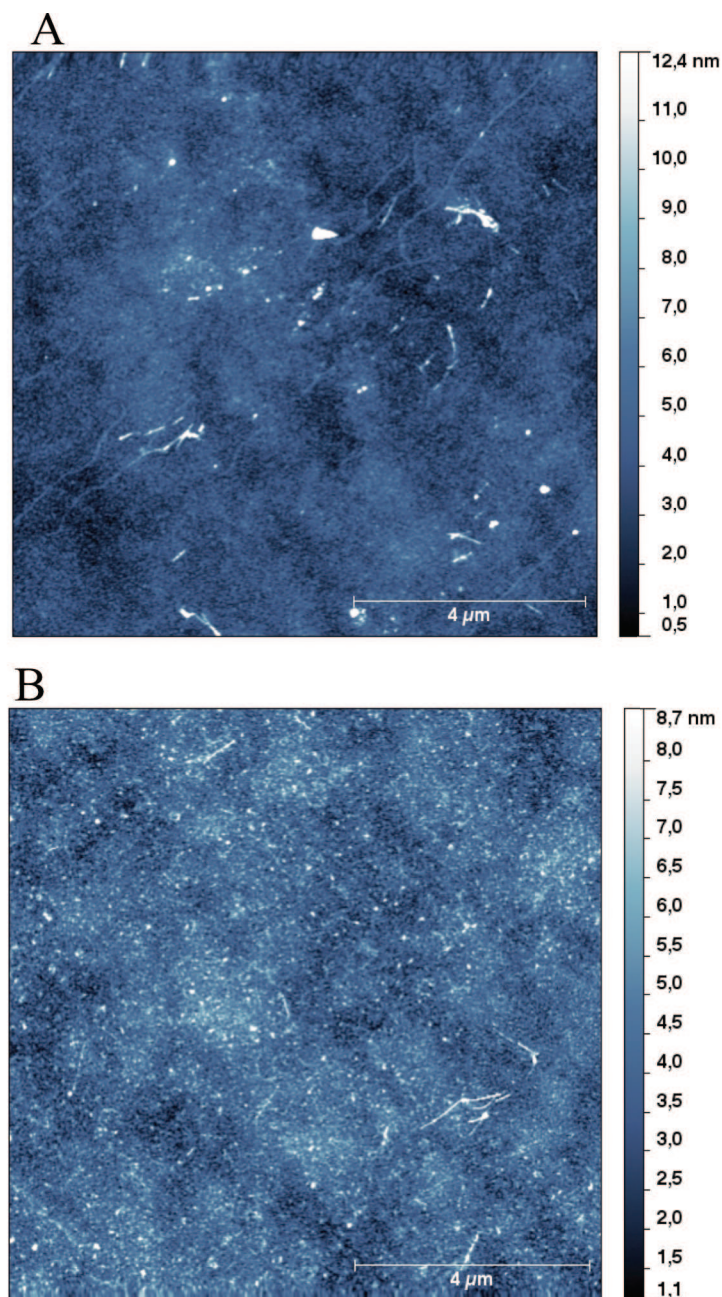


Où n est le coefficient de Hill qui permet de rendre compte des phénomènes de coopérativité au sein de la réaction, pour un n de 1 nous nous retrouvons dans le cas de l'équation de Michaelis-Menten, pour n supérieur à 1 nous sommes dans un système coopératif et pour n compris entre 0 et 1 nous sommes dans un système non coopératif. Et où K_{50} est une constante apparente de la réaction qui correspond à la concentration initiale divisée par deux à partir de laquelle nous obtenons le Y_{∞} (qui correspond également au point d'inflexion de la courbe de Hill). Nous pouvons remarquer que, quand nous appliquons cette équation au cas de l'ADP (où Y est la masse finale et X la concentration initiale en HsRad51) dans la figure 3.32-B, nous obtenons un coefficient de Hill d'environ 7. Ce fort coefficient de Hill vient renforcer ce que nous avons pu observer auparavant, c'est-à-dire un système très coopératif qui suite à la nucléation forme un unique filament de protéine avec un ajout successif de protéine de façon concertée.

A titre de comparaison nous avons enregistré des images AFM en topographie pour la même concentration initiale en HsRad51 (465 nM) en présence d'ADP (figure 3.33-A) et en présence d'ATP (figure 3.33-B). Les deux co-facteurs ont été préalablement mélangés avec la protéine avant de former le complexe pro-

téine/ADNsb.

FIGURE 3.33 – **Visualisation en topographie d'une surface d'or modifiée par de l'ADNsb après réaction avec HsRad51 (465 nM) mélangée A : avec de l'ADP et B : avec de l'ATP**



On remarque dans la figure 3.33-A, la présence de longs filaments de protéine due à un assemblage par le biais de l'ADP. En revanche, nous pouvons observer par comparaison dans la figure 3.33-B que les filaments formés par le biais de l'ATP sont plus courts et moins nombreux. Cette différence entre les deux surfaces en fonction du co-facteur rend bien compte de ce que nous avons pu observer en cinétique par la QCM, où la quantité en protéines était bien moins importante en présence d'ATP, du fait d'une régulation allostérique. Nous remarquons également que, pour le cas de l'ATP, les filaments formés, même si ils sont moins nombreux, possèdent une structure quasiment unique. Nous constatons en effet peu d'irrégularités dans les filaments, ce qui tend à dire que nous obtenons préférentiellement un seul filament par brin d'ADNsb. Nous pouvons supposer que l'hydrolyse de l'ATP favorise la formation de petits filaments de protéines, et que celle-ci est également défavorable à la formation de nucleus pour favoriser l'auto-association.

3.3 Etude de l'inhibition de la formation du complexe ADNsb/HsRad51

3.3.1 Introduction sur l'inhibition de HsRad51 par le peptide BRC4-28

La surexpression de HsRad51 dans les cellules cancéreuses les rend plus résistantes aux traitements anti-cancéreux. Cette résistance pourrait être réduite en jouant sur l'activité de HsRad51 lors de la recombinaison homologue. A partir de ce principe l'équipe de Masayuki Takahashi de l'U3B de l'Université de Nantes, a développé des inhibiteurs peptidiques à partir de la protéine BRCA2. Ces travaux ont été initiés lors de la thèse de Julian Nommé (soutenue le 20 janvier 2009) à travers des études structurales par modélisation moléculaire complétées par des approches expérimentales (fluorescence, anisotropie de fluorescence, gel retard entre autres). Ils ont pu à travers ces études ressortir un modèle de peptide inhibiteur de HsRad51, le peptide BRC4-28. Celui-ci a été conçu à partir des données cristallographiques de Pellegrini *et al.*, [127]. Ces derniers ont pu mettre en évidence que 28 résidus du peptide BRC4 étaient en contact avec la protéine et que celui-ci se plaçait de tel façon qu'il pourrait créer une rupture de l'interaction entre deux sous-unités de HsRad51. Ce peptide nommé BRC4-28 est composé des résidus 1521 à 1548 de la protéine

BRCA2. La figure 3.34 représente la structure secondaire de ce peptide en contact avec HsRad51.[139]

Le mécanisme d'inhibition de la protéine par le peptide BRC4-28 une interaction avec les molécules protéiques libres en solution. Les protéines se retrouve alors avec le peptide, sur la position qui permet l'auto-association et donc la formation du filament. Ils sont alors dans l'incapacité d'assurer la continuité du filament même si celles-ci venaient à former un nucleus sur l'ADNsb. Le schéma correspondant est représenté dans la figure 3.35.

Il semblait alors intéressant de valider notre système d'étude *via* l'utilisation d'un inhibiteur connu et ainsi confirmer ainsi le mécanisme d'interaction entre BRC4-28 et HsRad51 au moment de l'association de celle-ci avec l'ADNsb.

FIGURE 3.34 – **Structure et points de contacts du peptide BRC4-28 issu de la protéine BRCA2 avec la protéine HsRad51. La séquence en acide aminé du peptide est noté avec sa structure secondaire. Les résidus représentés en couleur sombre sont en fort contact avec HsRad51. La représentation 3D du peptide est également représenté ; d'après Nommé J. et al. [139]**

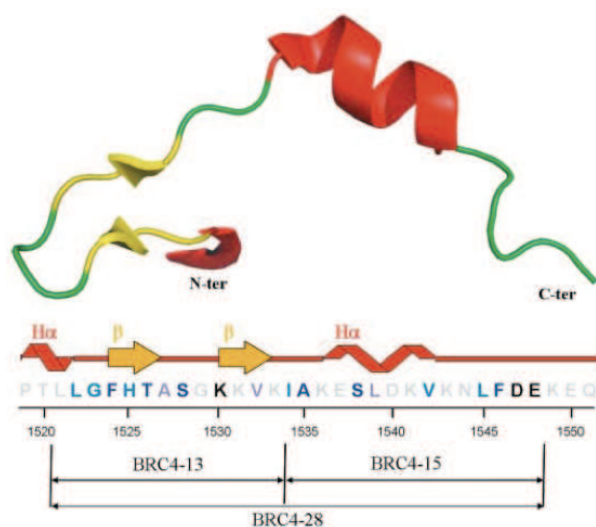
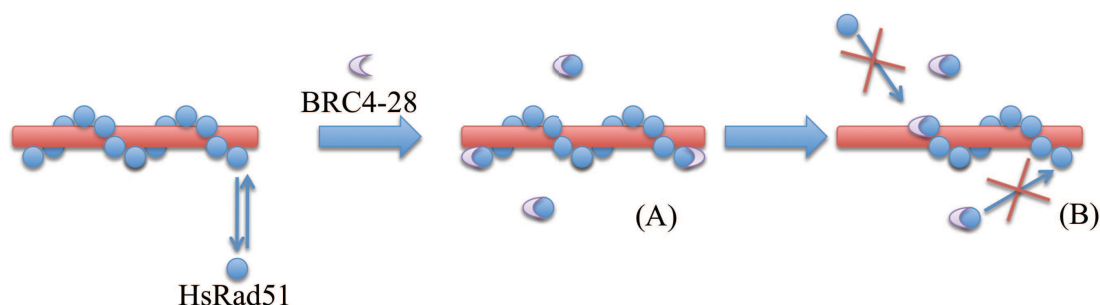


FIGURE 3.35 – **Schéma du mécanisme d'inhibition de la formation du complexe HsRad51/ADNsb**; Le peptide interagirait avec les molécules de HsRad51 libres (A). Ainsi piégées elles ne seraient plus capables d'assurer la continuité du filament (B)

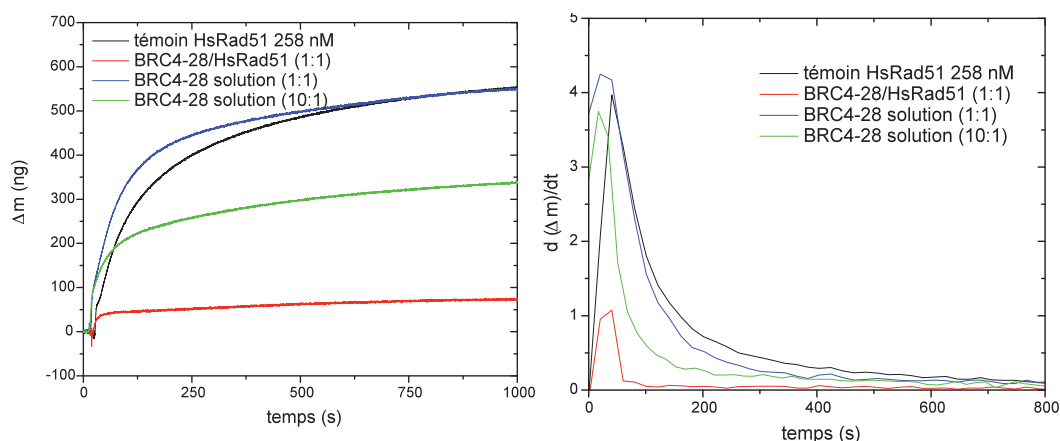


3.3.2 Première étude cinétique de l'association de HsRad51 avec l'ADNsb en présence de BRC4-28 via la QCM

Nous avons initié une étude cinétique sur l'inhibition de HsRad51. Nous avons ainsi travaillé sur l'association de la protéine en absence de co-facteur et en présence dans la solution de réaction de différents équivalents en BRC4-28. Nous avons également comparé les cinétiques à celles obtenues pour une injection de HsRad51 préalablement mélangée avec le peptide BRC4-28 pour un équivalent de HsRad51. Lorsque BRC4-28 se trouve d'abord en solution, nous avons enregistré pour chaque équivalent la variation de la masse à la surface du cristal de quartz. Pour chacune des mesures nous n'avons constaté aucune modification dans la masse. Ceci confirme que l'inhibiteur n'interagit pas avec l'ADNsb, ce qui est essentiel pour un inhibiteur spécifique. La figure 3.36 représente la variation de masse à la surface du cristal de quartz suite à l'injection de HsRad51 pour une concentration initiale de 258 nM avec ou sous BRC4-28, nous y représentons également les vitesses réactionnelles suite aux différents suivi cinétiques. Nous superposons donc à une courbe témoin de l'auto-association de HsRad51 un suivi où BRC4-28 (1 équivalent par rapport à HsRad51) est préalablement mélangé avec la protéine. Nous y superposons également deux suivis de la masse dans lesquels le peptide BRC4-28 est déjà présent en solution avant l'injection, pour des concentrations en peptide telles

que nous avons 1 et 10 équivalents par rapport à HsRad51.

FIGURE 3.36 – **Suivi de la masse suite à l'injection de HsRad51 à concentration initiale constante (258 nM) en présence ou non du peptide inhibiteur le BRC4-28 mixé ou non à la protéine avant injection**



La concentration initiale en HsRad51 de 258 nM a été choisie pour limiter l'effet bloquant de la nucléation par rapport à l'auto-association de la protéine. Nous constatons à ce propos que la variation de la masse pour 258 nM en protéine possède un très faible épaulement au début de la réaction, et que s'ensuit la réaction principale d'auto-association de la protéine. Dans le cas où nous ajoutons dans la solution de réaction, un équivalent de BRC4-28 par rapport à HsRad51, la prise de masse finale est équivalente à celle sans inhibiteur. Nous pouvons néanmoins remarquer que la présence de l'inhibiteur a tendance à modifier l'allure générale de la courbe. La vitesse y est légèrement augmentée en début de réaction. En revanche, celle-ci décroît beaucoup plus rapidement, ce qui revient à dire que la formation du complexe final s'est effectué de façon plus rapide que dans le témoin sans peptide. Ensuite, quand nous augmentons le nombre d'équivalents en peptide (10 équivalents) en solution par rapport à HsRad51, nous pouvons remarquer que la masse finale obtenue est inférieure à celle décrite précédemment. De plus la vitesse globale de la réaction décroît beaucoup plus rapidement, même si la vitesse initiale est équivalente. Nous pouvons donc supposer dans le cas de 10 équivalents en BRC4-28 par rapport à HsRad51, qu'il existe une réaction de compétition entre l'association de

HsRad51 avec l'ADNsb et de l'association de HsRad51 avec BRC4-28. En effet, la diminution de la masse finale de la réaction indique que la protéine n'a pas été en mesure de réagir complètement avec l'ADNsb et qu'une partie de celle-ci se trouve en solution sans pouvoir continuer la formation du filament de HsRad51 autour de l'ADNsb. Si nous comparons ces premiers résultats au mécanisme proposé pour l'inhibition de HsRad51 par le peptide BRC4-28, nous pouvons supposer lorsque l'inhibiteur est présent en solution, la protéine est capable de former dans un premier temps des complexes avec l'ADNsb et qu'ensuite l'inhibiteur s'associe avec les protéines en solution et également avec les protéines se trouvant en bout de chaîne du filament bloquant alors l'auto-association. Le fait que 10 équivalents de peptide par rapport à HsRad51 soient nécessaire pour pouvoir visualiser un effet conséquent de l'inhibition, tend à montrer que la constante d'association du peptide avec la protéine est inférieure à la constante d'association de la protéine avec l'ADNsb. Pour pallier cette compétition de réactions entre les trois réactifs (ADNsb, HsRad51 et BRC4-28), dans la figure 3.36 est représenté le suivi de la masse suite à l'injection de HsRad51 (concentration initiale de 258 nM) mixée au préalable avec un équivalent de BRC4-28. Nous remarquons ainsi dans ce suivi que la masse prise lors de cette réaction est bien inférieure à celle obtenue dans les cas où le peptide est en solution (et cela même pour 10 équivalents). Nous pouvons alors supposer dans ce cas que toutes les protéines sont en interaction avec un BRC4-28 et que dans ce cas la masse enregistrée correspond à des nucléus de HsRad51/BRC4-28 qui ne peuvent donner lieu à un filament du fait de la présence du peptide. Nous pouvons noter à ce propos que la masse finale obtenue est alors très proche de la masse correspondant à la fin de l'épaulement lorsque seule la protéine est injectée. Nous pouvons alors imaginer deux types de réactions qui dépendront de la façon dont BRC4-28 a préalablement réagi avec HsRad51 ou non.

Dans le cas le plus simple où HsRad51 est préalablement mélangée avec 1 ou plus d'un équivalent de BRC4-28, nous pouvons retrouver le schéma réactionnel suivant :



Dans ce cas, nous considérons que la concentration finale en complexe dé-

pendra uniquement de la capacité (nombre d'emplacement disponible) de la protéine couplée avec le peptide pour former des nuclei sur le simple brin d'ADN. Nous pouvons alors écrire l'équation de vitesse régissant cette réaction suivant :

$$v_{nucl}^1 = -\frac{d[HsRad51/BRC428]}{dt} = k_{nucl}^1[HsRad51/BRC428][ADNsb] \quad (3.25)$$

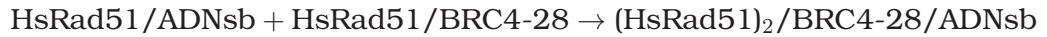
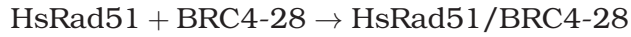
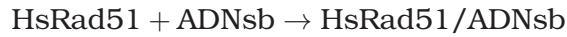
Et dans le cas où nous considérons que la concentration en pré-complexe HsRad51-BRC4-28 est en défaut par rapport à la concentration en ADNsb, on peut voir que cette concentration reste constante au cours de la réaction. Nous pouvons alors simplifier l'équation de vitesse qui devient :

$$v_{nucl}^1 = -\frac{d[HsRad51/BRC428]}{dt} = k_{nucl}^{1/app}[HsRad51/BRC428] \quad (3.26)$$

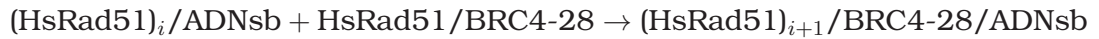
qui peut s'intégrer sous la forme de :

$$[HsRad51/BRC428] = [HsRad51/BRC428]_0 e^{-k_{nucl}^{1/app} t} \quad (3.27)$$

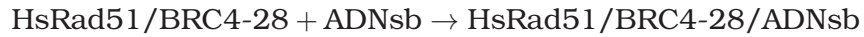
On peut alors, à partir de ce schéma réactionnel et des mesures que nous avons fait précédemment, décrire le schéma réactionnel suivant lorsque la protéine HsRad51 n'est pas préalablement mélangée avec le peptide mais que celui-ci se trouve dans la solution de la réaction pour $\forall i \in [2, n-1]$ où n est le nombre maximal de protéine :



réaction bloquée



réaction bloquée



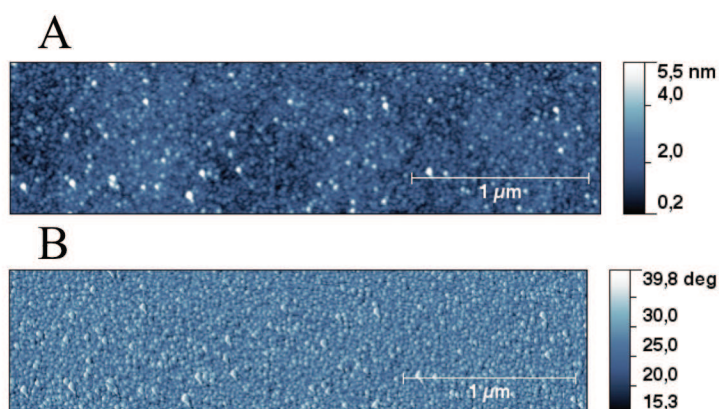
réaction bloquée

Il devient alors difficile de décrire correctement par la QCM une cinétique de ce type du fait que certaines réactions se passent en solution sans interagir

avec l'ADNsb. La QCM dans ce cas rend uniquement compte des complexes formés sur l'ADNsb, ceux-ci étant nombreux et tenant compte de cinétiques en compétitions nous ne développerons pas les équations de vitesses régissant ce système.

Pour terminer cette étude, la figure 3.37 représente une image en topographie et en phase obtenue par AFM. Nous pouvons alors voir que nous ne retrouvons pas de filament de protéines mais uniquement des petits complexes (ressortent en blanc dans la phase) qui s'apparentent plus à des nuclei, nous pouvons également deviner l'ADNsb parsemé de ces nuclei. Pour pouvoir réa-

FIGURE 3.37 – Visualisation par AFM d'une surface de chrome modifiée par de l'ADNsb après réaction avec HsRad51 (258nM) préalablement mélangée avec 1 équivalent de BRC4-28 ; A : Image selon la topographie ; B : Image selon la phase



liser cette étude par AFM sur BRC4-28, nous avons modifié une surface de chrome selon la procédure habituelle. Puis nous avons immobilisé de l'ADNsb, pour visualiser le complexe HsRad51/ADNsb formé dans les conditions où HsRad51 est mélangée au préalable avec le peptide BRC4-28 (1 équivalent par rapport à HsRad51). Nous avons utilisé une surface de chrome contrairement à l'or, car dans le cas de BRC4-28, nous ne nous attendions qu'à la formation de nuclei uniquement. Or, dans ce cas les complexes se trouvent être de plus petite taille. Dans le but de pouvoir les visualiser, le chrome, qui possède une rugosité de base de 0,2 nm, semble être plus adapté.

3.4 Conclusion du Chapitre 3

Durant ce chapitre nous avons pu mettre en avant l'utilisation d'une surface modifiée par un ADNsb d'environ 1700 acides nucléiques pour étudier l'interaction ADNsb / protéine. Cette interaction a pu être étudiée par analyse QCM et AFM. Ainsi, la QCM nous a permis d'obtenir un suivi en temps-réel de l'interaction tandis que l'AFM a permis de visualiser les complexes nucléo-protéiques.

Nous avons ainsi étudié la formation du nucléo-filament de HsRad51 avec l'ADNsb en présence ou non de co-facteurs, processus qui tient un rôle essentiel dans la recombinaison homologe et la réparation de l'ADN. De plus, après avoir rassemblé les données obtenues par la QCM en synergie avec la visualisation obtenue par AFM, nous avons pu proposer un modèle cinétique pouvant décrire la formation du filament nucléo-protéique. Ce modèle est particulièrement adapté dans le cas où l'ADP est préalablement mélangé à HsRad51 avant l'interaction avec l'ADNsb. Nous avons pu le comparer à la cinétique de la première phase observée expérimentalement par QCM lorsque HsRad51 est additionnée en absence de co-facteur. Ce modèle peut être résumé de la façon suivante :



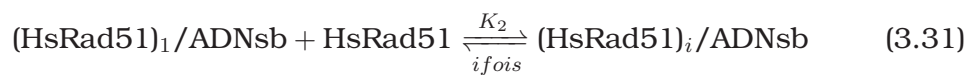
$$\Delta m_{total} = \frac{A_0}{k_2 - k_1} (1 + (k_1 - k_2)e^{-k_1 t}) \quad (3.29)$$

A partir de cette équation théorique de la masse, nous avons pu tirer les valeurs des constantes de vitesses de nucléation ($k_1 \text{ s}^{-1}$) et d'association ($k_2 \text{ s}^{-1}$). Ces valeurs sont représentées dans le tableau 3.2 ci-dessous. Enfin, à partir du rapport des constantes de vitesses d'association et de nucléation, nous avons pu discuter de la formation du filament et tout particulièrement de l'existence d'interstices dans le filament formé en absence de co-facteur (comparé à l'ADP).

TABLE 3.2 – **Report des différentes constantes de vitesses obtenues par la modélisation de la réaction de HsRad51 en présence ou non de co-facteurs vis-à-vis de l'ADNsb**

co-facteur	[HsRad51] ₀ (nM)	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	k ₂ / k ₁	r ²
absence	465	0,53	1,53	2,89	0,997
	517	0,48	1,47	3,06	0,998
	645	0,73	1,74	2,38	0,996
	775	0,70	1,71	2,44	0,999
	1033	0,73	1,72	2,35	0,999
ADP	465	0,0073	1,003	137	0,998
	517	0,0042	0,997	230	0,999
	645	0,0022	0,976	443	0,998
	775	0,0021	0,976	464	0,998

Dans le cas où le co-facteur est l'ATP, notre méthodologie nous conduit à proposer une succession d'équilibre réactionnelle du type :



Et tout particulièrement, nous avons pu appliquer notre méthodologie à la mesure des interactions entre HsRad51 et ADNsb en présence d'un inhibiteur peptidique : BRC4-28. En fonction du mode de mise en contact (en solution et mélangé préalablement à la protéine et en fonction de sa concentration), nous avons pu confirmer son mécanisme d'interaction vis-à-vis de la protéine (n'interagissant pas avec l'ADNsb), mécanisme qui avait été supposé à l'appui de techniques biochimiques développée par l'équipe de biochimie de l'U3B.

Chapitre 4

Extension du système d'étude vers la formation du complexe ADNdb / Transposase

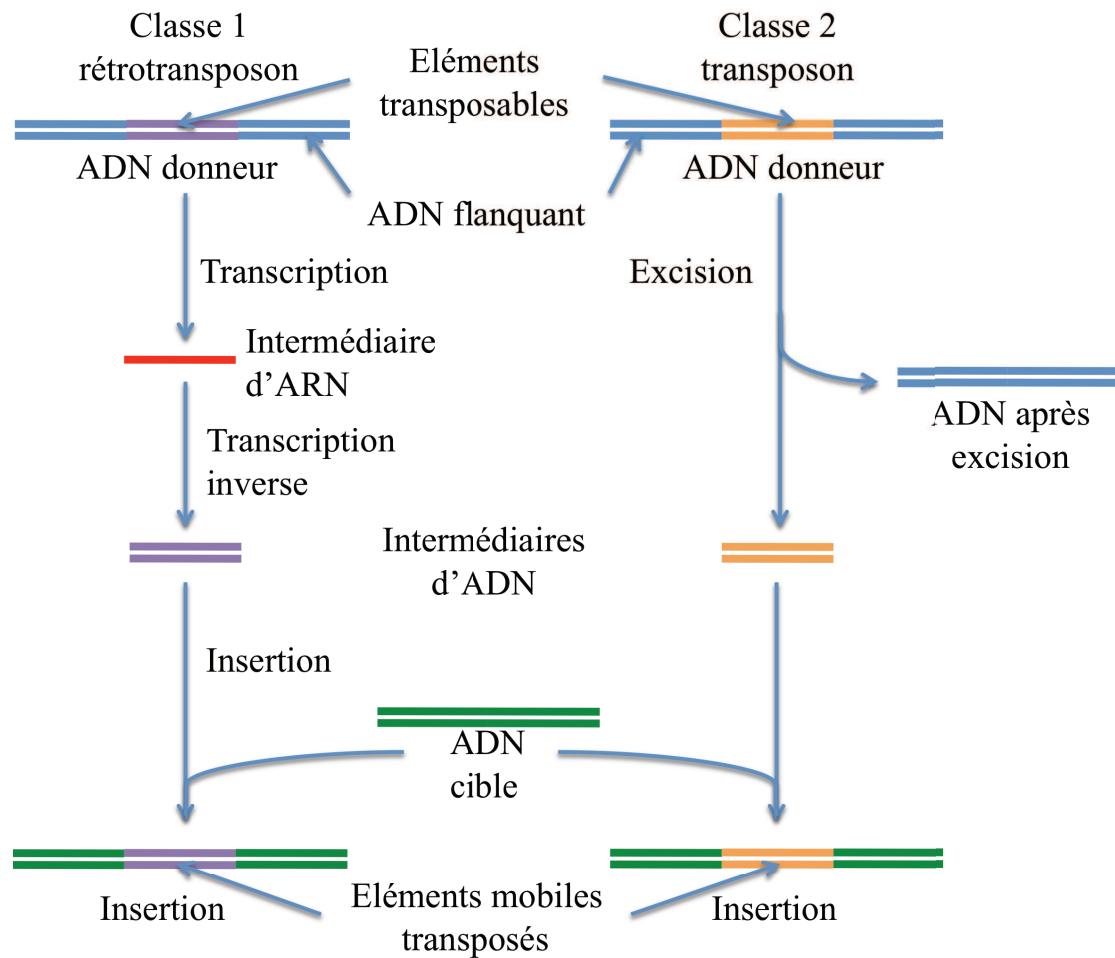
Avant-propos. Les éléments transposables (désormais noté ET), encore appelés gènes sauteurs ou éléments mobiles, sont des séquences d'ADN qui se déplacent au sein même du génome hôte. Ces séquences peuvent représenter, dans certains organismes, une majorité des séquences d'ADN présentes dans le génome (cf. tableau 4.1). Le fait qu'ils se déplacent de séquence en séquence, les amènent à pouvoir provoquer des remaniements de l'ADN appelés plasticité du génome. Ce sont précisément ces remaniement qui conduisent à l'évolution des espèces.

TABLE 4.1 – **Pourcentage d'éléments mobiles au sein de différents génomes hôtes**

Espèce	% du génome occupés par des ET
Bactéries	1 - 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure)	3
<i>Arabidopsis thaliana</i> (végétal)	10
<i>Drosophila melanogaster</i> (drosophile)	15
<i>Homo sapiens sapiens</i>	45
<i>Zea mays</i> (maïs)	60

Chez les eucaryotes les éléments transposables sont répartis en deux classes, les éléments de classe 1 ou rétrotransposons, et les éléments de classe 2 ou transposons. Dans la figure 4.1 sont représentés les mécanismes généraux de la transposition pour les classes 1 et 2.

FIGURE 4.1 – **Schéma général de la transposition des éléments transposables de classes 1 et de classe 2**



Les deux classes se distinguent par leurs intermédiaires de transposition, qui est une copie d'ARN pour la classe 1 et un ADN pour la classe 2. Pour les éléments de classe 1, l'ADN est transcrit en ARN messager ; cet ARN est ensuite

copié en ADN capable de s'insérer dans un site cible. Leur mode de transposition est dit "réplicatif" ou de type "copier-coller". Les éléments de classe 1 sont également appelés rétro-éléments car leur déplacement (la rétrotransposition) se caractérise par un flux inverse de celui de l'information génétique, c'est-à-dire de l'ARN vers l'ADN. On appelle élément d'ADN les éléments de classe 2, car ceux-ci se déplacent eux-mêmes d'un site du génome à un autre. Leur mode de transposition est dit "conservatif" ou de type "couper-coller". Au contraire des éléments de classe 1, les éléments de classe 2 peuvent être excisés du site donneur, pour s'insérer dans un site cible. Que ce soit pour les ET de classe 1 ou de classe 2, les remaniements qu'ils engendrent provoquent une recombinaison de l'ADN. Les enzymes de la transposition à la manière de Rad51 sont des recombinases.

Ainsi, au sein de ce chapitre, nous étudierons le transposon de classe 2 *Mos1* découvert chez la mouche drosophile dont le mécanisme a largement été étudié dans la littérature. Nous étendrons notre système d'étude à l'interaction entre le transposon et son enzyme, la transposase MOS1. Cette interaction nous permet d'envisager l'accroche d'un ADNdb sur la surface (contrairement à HsRad51 qui nécessitait un ADNsb). Elle autorise également l'étude de la cinétique d'une protéine, interagissant spécifiquement avec une séquence d'ADN donnée.

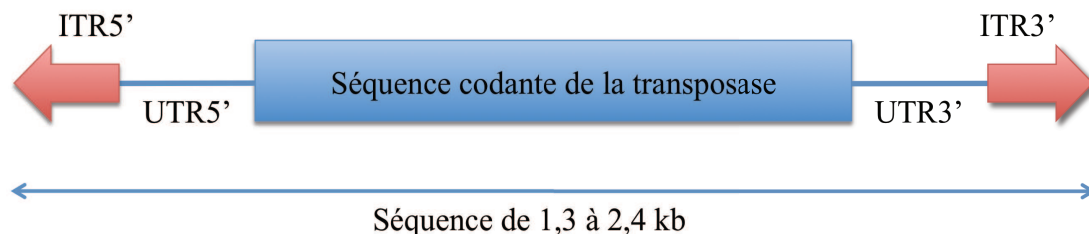
4.1 Les Transposases de classe 2 et leurs transpositions - L'exemple de Mos1

L'élément *Mos1*, appartient à la super-famille IS630-*Tc1-mariner*, et plus particulièrement à la famille des MLE (pour *mariner-like-element*). [140] Celui-ci a été découvert chez *Drosophila mauritiana* par Jacobson et Hartl en 1985. [141] Compte-tenu du fait que les étapes ont été particulièrement bien étudiées dans le cadre de la phase de formation du complexe MOS1 / ADNdb, nous avons choisi d'étendre notre système d'étude à la formation de ce complexe. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration supplémentaire au projet de départ avec l'équipe de Corinne Augé-Gouillou (Université de Tours).

4.1.1 Le mode de transposition de type couper-coller

Dans le cas de l'élément *Mos1*, le mode de transposition est de type "couper-coller". Celui-ci consiste, *via* la protéine MOS1 codée par cet ET, en la coupure de l'ADNdb aux extrémités de la séquence de l'ET. L'ET est ensuite transporté par sa protéine vers un autre ADNdb possédant un site d'insertion spécifique (qui possède un enchaînement nucléique de type TA). Pour ce faire, la séquence codant la protéine permettant d'assurer le mécanisme de transposition doit posséder en plus de sa séquence codante, des séquences spécifiques qui autorise la liaison à la protéine. De son côté, la protéine doit posséder une forme secondaire et tertiaire (voire quaternaire) assurant la liaison et la coupure de l'ADNdb. Nous retrouvons alors dans la super-famille *ITm*, et particulièrement dans le cas de *Mos1*, des séquences nucléiques encadrant la séquence codante appelées ITR (pour Inverted Terminal Repeat). Les ITR servent alors de séquences spécifiques lors de la liaison avec la protéine MOS1. Nous pouvons alors schématiser de façon générale la séquence d'ADNdb mobile selon la figure 4.2. Les séquences UTR représentées dans la figure 4.2 pourraient servir de séquences régulatrices lors de la transcription du gène de la *transposase*. Comme indiqué, la protéine (MOS1) ainsi codée doit posséder deux domaines

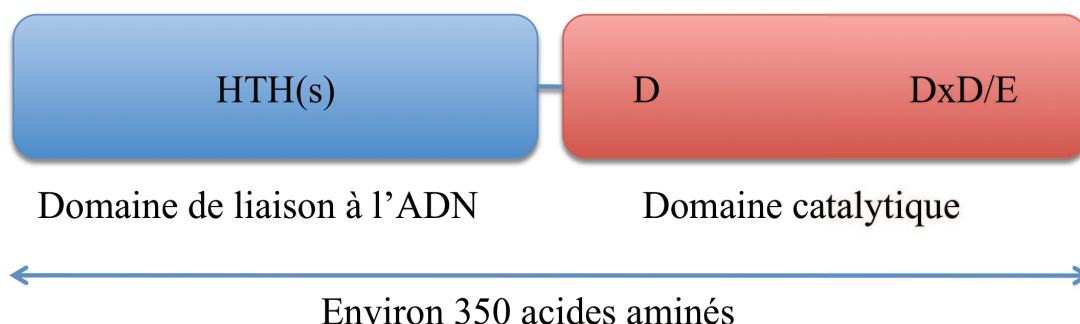
FIGURE 4.2 – **Schéma général d'une séquence type d'un gène mobile encadré par ses deux séquences spécifiques (ITR) servant à la liaison avec sa protéine, pour la famille *ITm***



spécifiques, l'un possédant la capacité de se lier à l'ADNdb et l'autre possédant la capacité de catalyser la coupure de l'ADNdb. Dans la super-famille des *ITm*, la partie N-terminale de la protéine est le domaine de liaison à l'ADN. Ce domaine contient au moins un motif hélice-tour-hélice appelé aussi HTH. L'enchaînement HTH, de part sa forme secondaire et ses acides aminés, est

spécifique à une partie de la séquence contenue dans l'ITR. [142] Nous retrouvons également pour le domaine catalytique, le domaine identifié par une triade catalytique DDxD/E où x correspond à la distance en acide aminé entre le deuxième et le troisième acide catalytique. La triade catalytique intervient donc lors de la coupure de l'ADNdb au niveau des ITR lors de la phase d'excision. Nous pouvons alors schématiser la séquence protéique d'une Tpase de la super-famille *ITm* selon la figure 4.3.

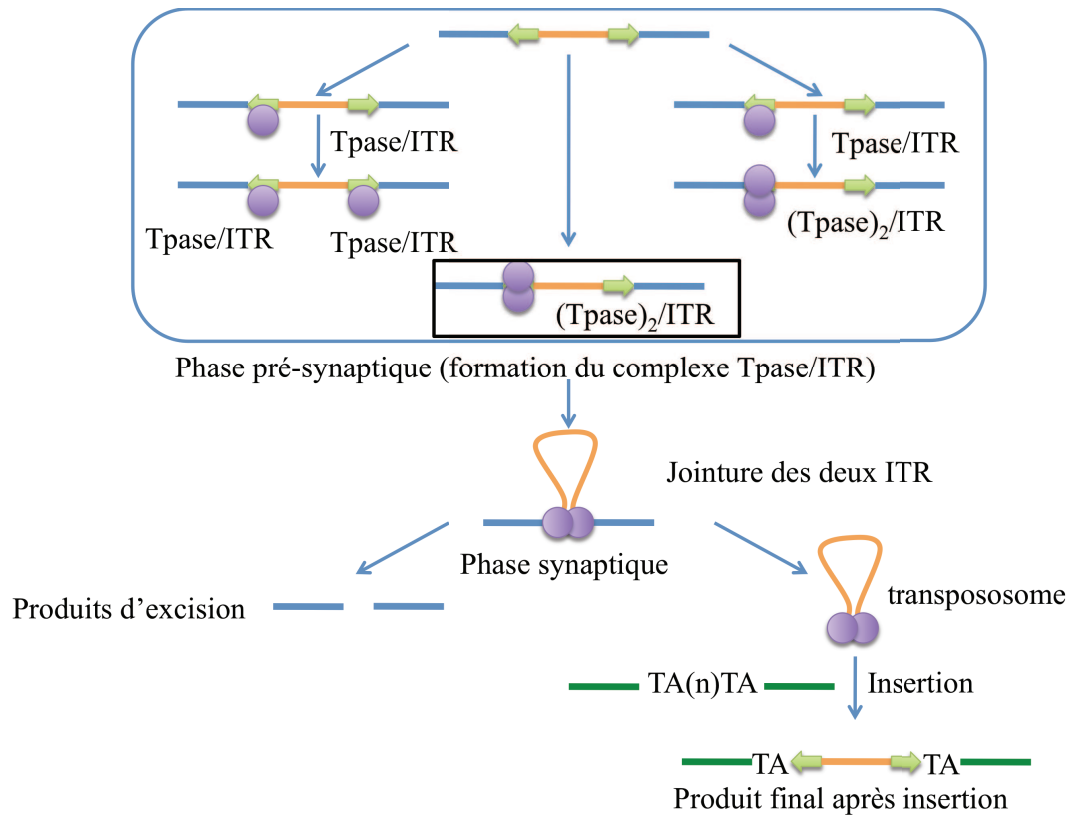
FIGURE 4.3 – **Schéma général d'une séquence type d'une Tpase de la super-famille *ITm* comprenant le(s) enchaînement(s) HTH et la triade catalytique DDxD/E**



Les ET de la super-famille *ITm* et tout particulièrement *Mos1*, possèdent un mode de transposition de type "couper-coller". [143] Le schéma de la figure 4.4 présente avec plus de détails le mécanisme de type "couper-coller". Celui-ci peut être résumé en trois principales étapes. La première est la phase pré-synaptique ou étape de liaison. Elle consiste en la formation du complexe entre la Tpase et les ITR de l'ET. Cette phase (cf. figure 4.4 phase pré-synaptique) peut être décrite selon trois voix. En effet, la formation du pré-complexe Tpase / ITR peut se dérouler, soit à partir d'une forme monomérique de la protéine, soit à partir d'une forme dimérique de la protéine. Dans le cas d'une forme de départ dimérique, la protéine se fixe directement sur un des ITR de l'ET pour former un complexe de type (Tpase)₂/ITR. Dans le cas où la protéine se trouve sous une forme monomérique, celle-ci peut se fixer soit aux deux ITR pour former deux complexes Tpase/ITR. Si tel n'est pas le cas, elle se fixe en premier

sur un ITR, puis une autre Tpnase sous forme monomérique vient s'ajouter à la première pour former au final un complexe de type $(Tpnase)_2/ITR$. [144, 145]

FIGURE 4.4 – **Schéma général du mécanisme de transposition de type couper-coller**



Une fois le complexe formé, il y a transport de celui-ci vers le second ITR dans le cas où celui-ci s'est formé uniquement sur un ITR. Sinon, les deux pré-complexes formés sur chaque ITR se joignent pour, au final, dans chacun des cas, former le complexe dit synaptique. Pour l'instant, lors de ces précédentes phases, seuls les domaines de liaisons HTH de la protéine à l'ADNdb (ITR) étaient concernés. Une fois le complexe synaptique formé, le domaine catalytique, *via* un co-facteur de type cation divalent (Mg^{2+} , Mn^{2+}) [146], excise l'ADNdb au niveau des extrémités des ITR. Les produits de l'excision sont

les deux brins d'ADN séparés de leur ET central; et le second produit est un complexe appelé transpososme (ou intermédiaire de transposition) comportant l'ET lié par ses ITR par la Tpase sous une forme circulaire (complexe transposon/Tpase). Il est à noter que la cassure de l'ADNdb est réparée par les mécanismes intra-cellulaires de recombinaison de l'ADNdb (recombinaison homologue RH et non-homologue NHEJ). [147, 148]

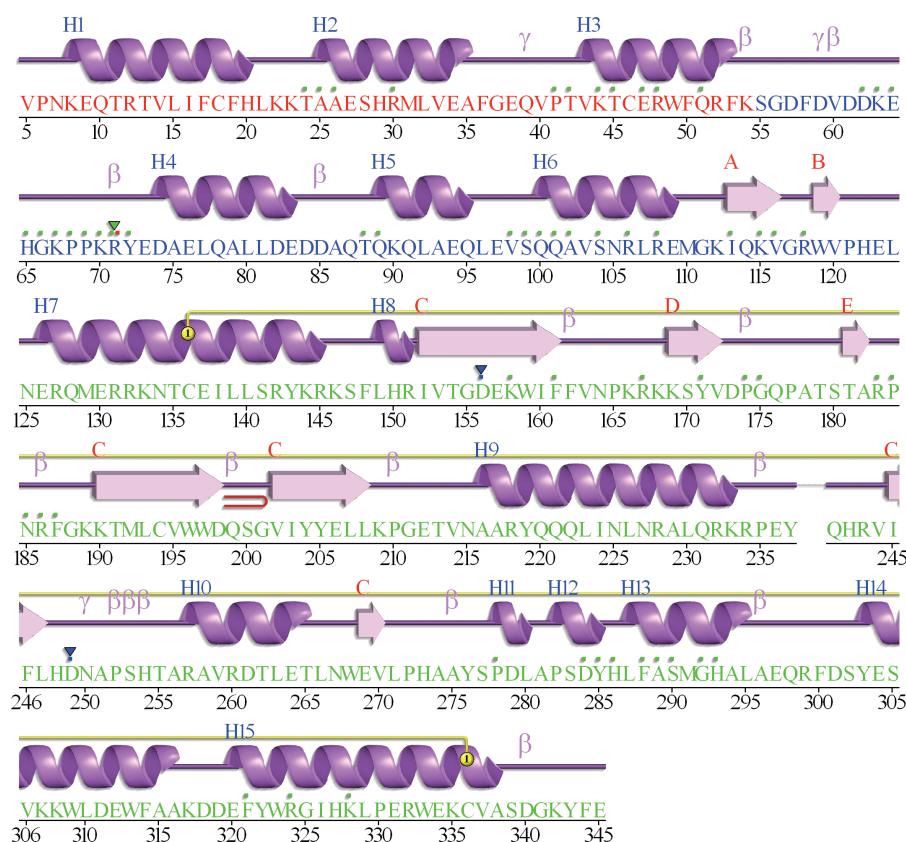
La dernière étape du processus est l'insertion du transpososme dans une séquence d'ADNdb hôte. La Tpase permet de faire le lien entre les deux séquences d'ADNdb (par la résolution des jonctions de Holyday). Il a été remarqué que l'insertion se faisait préférentiellement dans des séquences contenant l'alignement dinucléique TA, il existe quelques variantes de la séquence avec l'insertion d'acide nucléique entre les deux TA.[149] Il a également été remarqué l'existence de certaines séquences nucléiques présentes à la suite du dinucléotide.[150] Dernièrement, il a également été noté que la forme de l'ADNdb pouvait jouer un rôle important lors de l'insertion du transpososme, tout particulièrement dans des zones riches en TA provoquant une forme relâchée de l'ADNdb.[151]

Chaque étape de la transposition a été tout particulièrement discutée. Pour notre système d'étude, nous avons choisi de nous intéresser à la première phase pré-synaptique. Nous observerons donc la formation du pré-complexe lors de l'interaction de la Tpase MOS1 avec ses propres ITR. Pour ce faire, il est nécessaire de détailler un peu plus la formation et la forme du pré-complexe MOS1/ITR afin de pouvoir discuter des cinétiques envisagées dans la section suivante (section 4.2).

4.1.2 Détails de la formation du complexe pré-synaptique MOS1 - ADNdb

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe trois grandes étapes durant la transposition d'un ET. Seulement, c'est la première étape qui conditionnera l'ensemble de la réaction. En effet, la formation du pré-complexe pour la protéine MOS1 et tout particulièrement sa forme quaternaire (forme dimérique active) est déterminante pour la suite de la réaction de transposition.[152]

FIGURE 4.5 – **Séquence d'acides aminés de la protéine MOS1 comprenant les différents domaines de la protéine obtenue par cristallographie des rayons X. H1, H2... représentent les zones en hélice α . A, B... représentent les feuillets β . Les symboles γ et β représentent respectivement les coudes γ et β . Les points verts représentent les acides aminés en interaction avec l'ADN. Les points représentent les acides aminés complexés avec le cation métallique Mg^{2+} , d'après les travaux de Richardson et al. [153]**



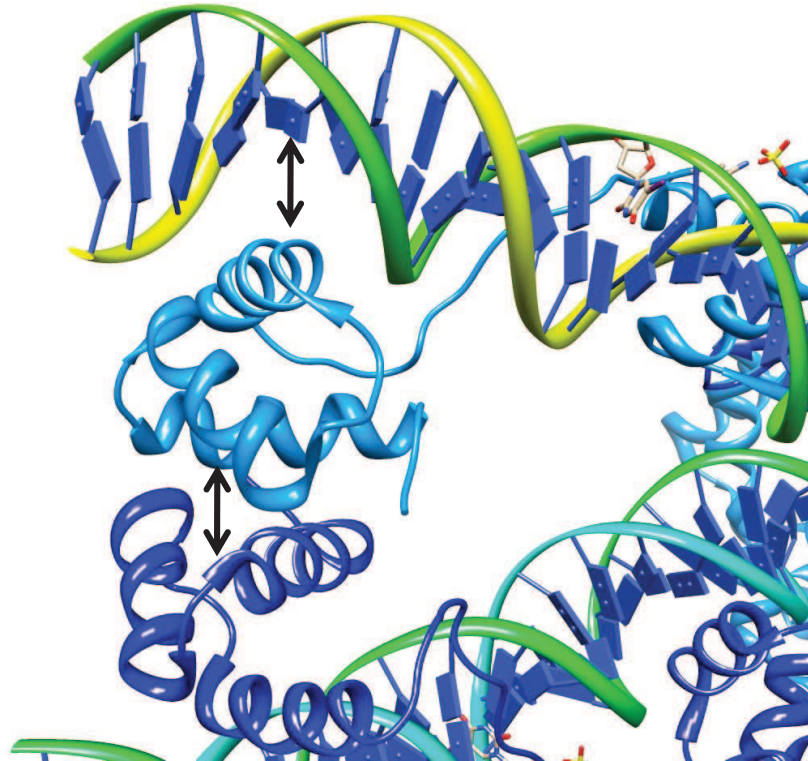
Pour pouvoir discuter de l'activité de la protéine MOS1 durant la formation du complexe, il est nécessaire de faire un point sur sa structure même. La séquence protéique de MOS1 est représentée dans la figure 4.5. Celle-ci est constituée de 345 acides aminés, et possède les différents domaines caractéristiques des transposases de la super-famille *ITm*. Ainsi, sur la figure 4.5, nous retrouvons en partant de la position N-terminale, l'enchaînement de trois hélices α appartenant au premier enchaînement d'hélices permettant la liaison spécifique avec l'ITR. S'ensuit un enchaînement de trois hé-

lices α qui appartiennent au deuxième enchaînement d'hélices participant à la liaison à l'ADNdb. Ces deux enchaînements d'hélices séparés par une séquence d'acides aminés constituent le domaine HTH. Puis, nous retrouvons deux courts feuillets β qui s'interposent entre le domaine de liaison à l'ADNdb et le domaine catalytique de la protéine. Dans la partie catalytique (à partir de l'acide aminé 125) nous retrouvons la triade catalytique D₁₅₆-D₂₄₉-D₂₈₄, qui correspond à la disposition des Aspartes permettant non seulement la complexation du cation divalent mais aussi la catalyse de la coupure de l'ADNdb.

Même si la séquence de MOS1 est bien connue, sa première cristallographie complète est apparue uniquement en 2009 dans le travail de Richardson *et al.*. La protéine a été cristallographiée sous forme de dimère en complexe avec ses ITR (complexe synaptique (MOS1)₂ / ITR). Les différents domaines sont représentés dans les figures 4.6, 4.7, 4.8 et 4.9. [153] Tout d'abord, deux points importants ressortent quant au positionnement de la protéine : d'une part, celle-ci se trouve sous forme dimérique, d'autre part, le dimère est sous une forme *trans*. La forme *trans* du dimère est caractérisée par un croisement de l'intersection (contenant les deux courts feuillets β décrit précédemment) des parties des deux protéines entre les domaines de liaisons à l'ADNdb et du domaine catalytique. Les feuillets β de chacun des monomères se trouvent dans des états parallèles et anti-parallèles, ce qui facilite l'interaction entre les deux protéines, comme le montre la figure 4.8. Cet état *trans* de la protéine implique également que, le long du même ADNdb nous retrouvons le premier HTH et le domaine catalytique d'un des monomères, mais également le deuxième HTH participant à la liaison à l'ADNdb appartient au second monomère (que nous pouvons également remarquer sur la figure 4.8).

Dans la figure 4.6 est représenté le premier domaine de liaison à l'ADNdb du HTH se trouvant en N-terminal. Nous pouvons voir que l'une des hélices α (acides aminés 42-55) est directement en interaction avec le creux du sillon de l'ADNdb (interaction de type hydrophobe-hydrophobe caractéristique des sites de liaison à l'ADNdb à partir d'un système HTH). Mais nous notons également que la partie extérieure de l'enchaînement d'hélices est lui aussi en interaction avec l'autre premier domaine d'hélices du HTH du second monomère. Nous supposons donc que cette double interaction au niveau de l'ITR facilite d'une part la liaison à l'ADNdb, mais renforce d'autre part, la forme dimérique de la

FIGURE 4.6 – **Représentation en trois dimensions de la structure cristallo-graphique de la protéine MOS1 d'après les travaux de Richardson et al. ; représentation du premier domaine de liaison à l'ADN à partir de la position N-terminale et également en interaction avec le premier domaine de liaison du second monomère du complexe protéique. (PDB : 3HOT) [153]**



protéine.

Dans la figure 4.7 est représenté le second domaine de liaison à l'ADN du HTH dont l'une des hélices α (acides aminés 99-110) interagit également avec le creux du sillon de l'ADNdb.

FIGURE 4.7 – **Représentation en trois dimensions de la structure cristallo-graphique de la protéine MOS1 d'après les travaux de Richardson et al. ; représentation du deuxième domaine de liaison à l'ADN en interaction avec l'ADNdb. (PDB : 3HOT) [153]**

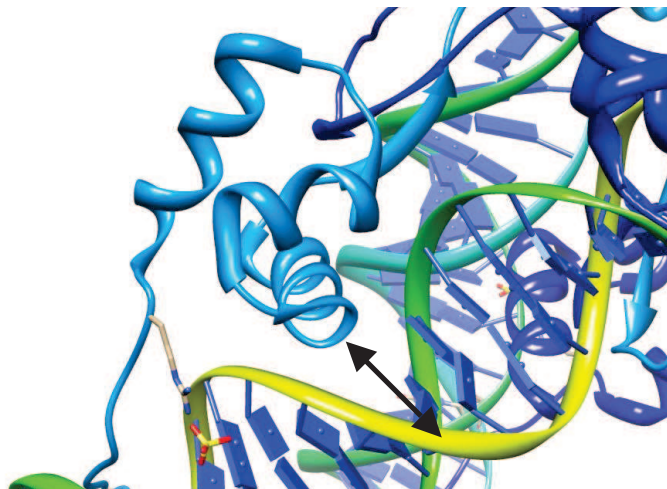
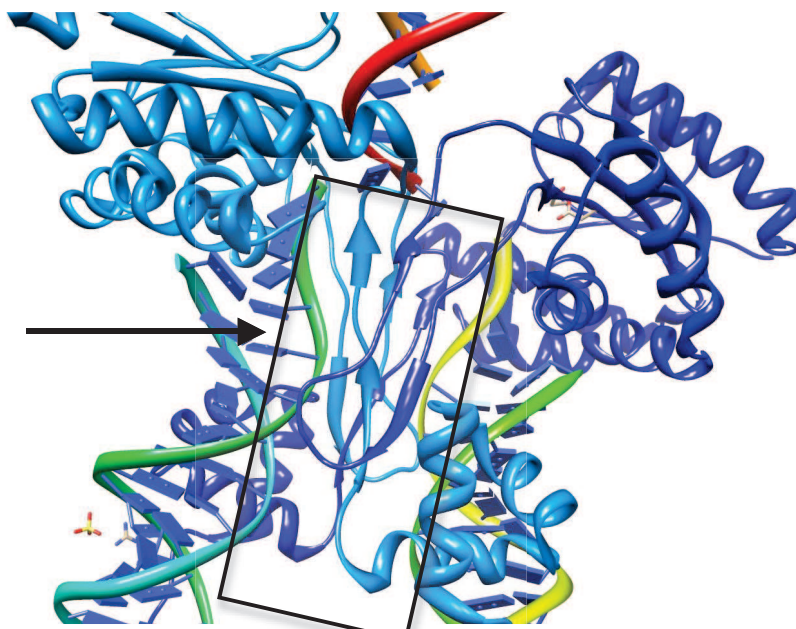
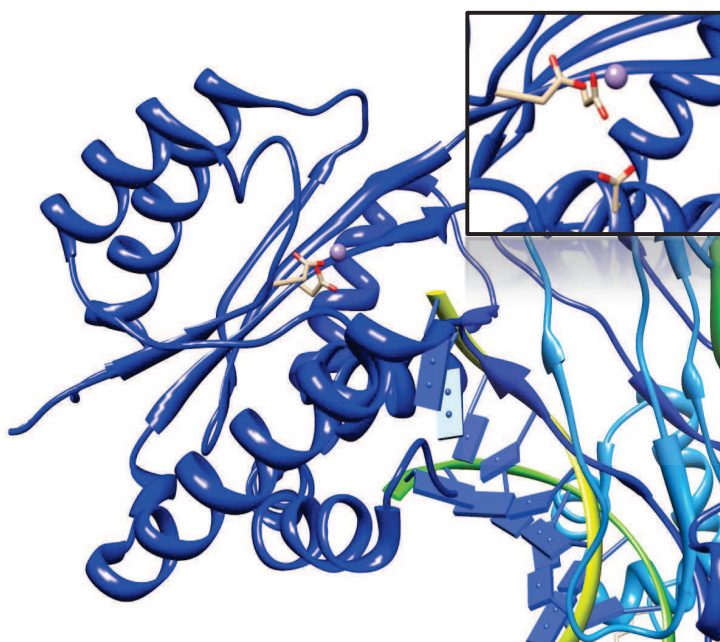


FIGURE 4.8 – **Représentation en trois dimensions de la structure cristallo-graphique de la protéine MOS1 d'après les travaux de Richardson et al. ; représentation du domaine central positionné entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine catalytique. (PDB : 3HOT) [153]**



Pour conclure, dans la figure 4.9 est représenté le domaine catalytique de la protéine MOS1. Est également représentée, avec un zoom dans le coin supérieur droit, la zone où est située la triade catalytique (représentation sous forme d'atome) avec la présence d'un cation Mg^{2+} ; ceci fait état d'une forme caractéristique de poches catalytiques de type endonuclease. [154]

FIGURE 4.9 – **Représentation en trois dimensions de la structure cristallographique de la protéine MOS1 d'après les travaux de Richardson et al. ; représentation du domaine catalytique de la protéine, coin supérieur droite : zoom sur la triade catalytique complexée avec Mg^{2+} . (PDB : 3HOT) [153]**



Pour terminer cette étude sur la formation du complexe, il faut citer le travail de Carpentier *et al.* de l'équipe du Pr. Corinne Augé-Gouillou. [152] Ces derniers, avec une approche biochimique, ont pu confirmer la formation d'un dimère sur l'un des ITR facilitant alors la transposition complète de l'ET *Mos1*. En effet, à travers l'utilisation de 12 mutants de la protéine MOS1, il a pu être montré qu'il existait un pré-équilibre en solution entre la forme monomérique et la forme dimérique de la protéine. La forme dimérique facilite la fixation de la protéine à l'ITR, avec notamment l'aide d'un mutant le D279G où l'Aspar-

tate 279 est remplacé par une Glycine ce qui empêche la coupure catalytique de l'ADNdb lors de la phase synaptique. Il a également été montré, *via* des mutants protéiques, que la forme monomérique ne peut conduire à la transposition (faible fixation de protéines sur les ITR). D'autres mutants ont permis de mettre en avant que le premier domaine HTH en N-terminal avait deux rôles, le premier est la dimérisation et le second est la fixation aux ITR. En effet, lorsque ce domaine est retiré de la protéine, la protéine ne peut conduire à la transposition de l'ET.

En tenant compte de la formation d'un unique dimère sur l'un des ITR, il devient alors intéressant, dans notre système, de fixer un ADNdb contenant les ITR spécifiques de l'ET *Mos1* à la surface du cristal de quartz. Nous pourrions alors, en considérant que, seule la forme dimérique permet de former le complexe (MOS1)₂ / ITR, étudier et modéliser les cinétiques d'interactions.

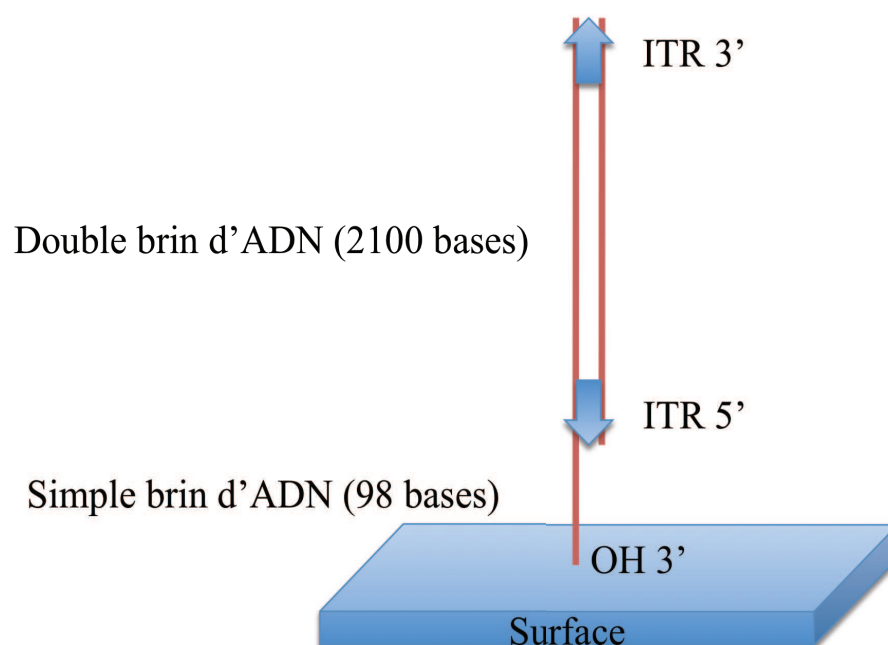
4.2 Etude de la formation du complexe ADNdb / Transposase

4.2.1 Etude cinétique et mécanistique de l'étape de complexation de MOS1 avec ses ITR - Utilisation de la protéine MOS1 produite en système bactérien

Cette étude cinétique a donc été réalisée sur deux lots de la protéine sauvage de MOS1. La différence entre les deux lots provient de la production de la protéine. La première est produite en milieu bactérien et la deuxième est produite en milieu eucaryote. L'équipe de Corinne Augé-Gouillou a remarqué une différence d'activité et dans la forme du complexe avec l'ITR entre les deux productions de protéines. Ainsi, après avoir immobilisé de l'ADNdb selon la procédure du chapitre 2, nous étudierons la variation de la fréquence (masse) en fonction de la protéine injectée et pour diverses concentrations. Il sera alors possible de modéliser leurs cinétiques et donc leurs mécanismes. Pour cela, nous avons synthétisé une séquence double brin d'ADN à partir d'un plasmide contenant la séquence appropriée. Cette séquence contient les deux ITR. Pour faciliter l'accroche du double brin, l'extrémité 3' contient une partie simple brin de 98 bases. Pour créer cette séquence, nous avons synthétisé les séquences simple brin séparément par PCR asymétrique et nous les avons assemblées

par hybridation (cf. annexe). Cette séquence est ensuite additionnée à la surface du quartz modifié par Ar-SO₂Cl. Nous obtenons la surface modifiée représentée dans la figure 4.10.

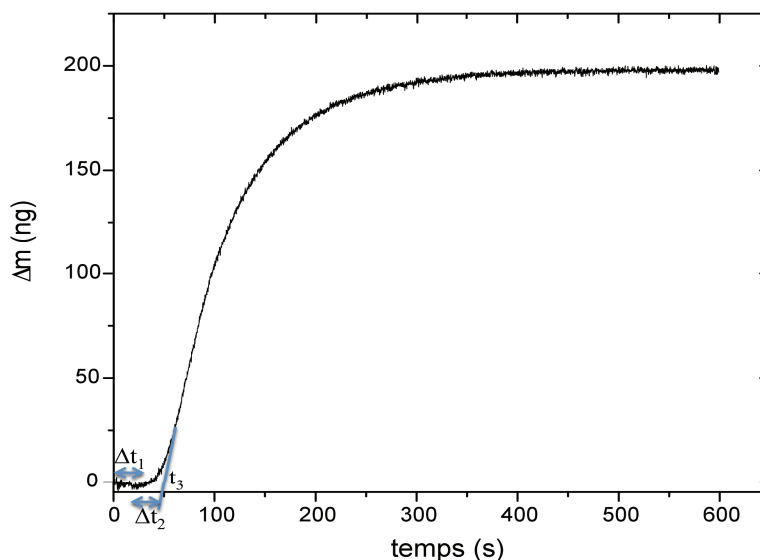
FIGURE 4.10 – **Schéma de la surface modifiée utilisée pour étudier l'interaction MOS1 / ITR**



Ensuite dans un Tampon Tris.HCl (20 mM) NaCl (100 mM) Mg²⁺ (5mM), nous additionnons une série de cinq concentrations en MOS1 bactérien (produite en milieu bactérien) (0,01 0,03 0,05 0,07 et 0,09 μ M). Nous suivons alors, *via* QCM, l'évolution de la masse à la surface, qui représente la quantité de protéine fixée à l'ADNdb (et donc aux ITRs). Suite à l'injection, nous constatons différents phénomènes (figure 4.11). Le premier temps (Δt_1) est une période de latence entre le moment où il y a eu injection de la protéine et le début de la prise de masse. Ce phénomène peut être attribué au temps de diffusion de la protéine en solution jusqu'à la surface où se trouve l'ADNdb. Le deuxième temps (Δt_2) correspond au régime pré-stationnaire de la réaction enzymatique. Le troisième temps (t_3) correspond à ce que nous qualifierons de temps initial de la réaction enzymatique (et auquel nous attribuerons la vitesse initiale de

la réaction).

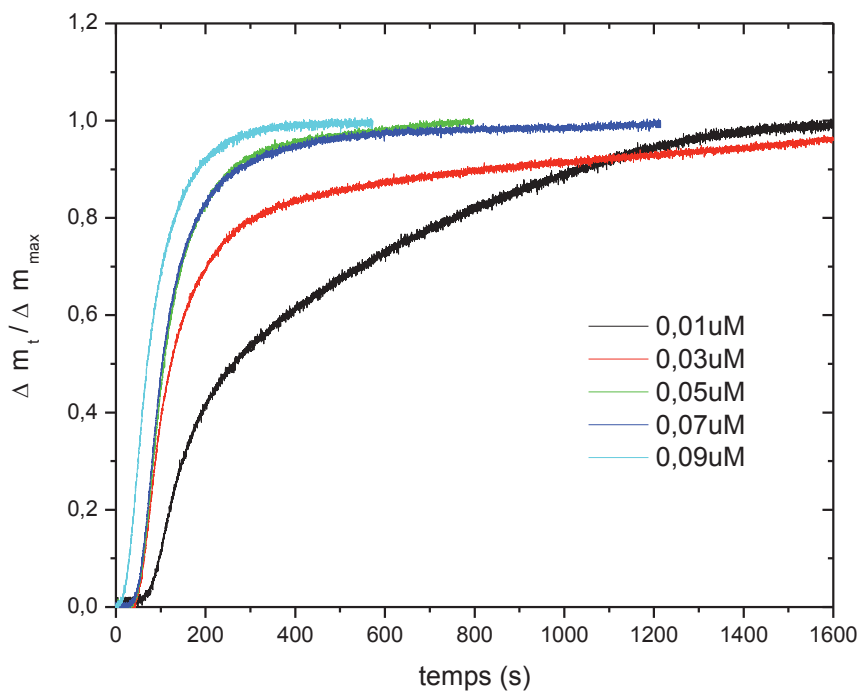
FIGURE 4.11 – **Suivi cinétique par la microbalance à cristal de quartz suite à l'injection de MOS1 bactérien $0,09 \mu\text{M}$; description des différents phénomènes**



Etant donné que pour cette protéine, nous ne pouvons réutiliser la surface suite à une modification (le complexe n'a pas réussi à être dissocié comme pour HsRad51 avec du SDS), nous utilisons alors pour chaque concentration une nouvelle surface. Nous constatons que, pour chaque concentration, nous obtenons toujours à peu près la même masse finale à l'équilibre. Ainsi, pour faciliter l'exploitation des résultats, les cinétiques suivantes sont représentées de façon relative à la masse finale obtenue ($\frac{\Delta m_t}{\Delta m_\infty} = f(t)$) qui est donc relative à la quantité d'I_{TR} disponible pour la réaction (figure 4.12).

Pour pouvoir rendre compte de la cinétique de la réaction, nous reportons la dérivée de la masse normalisée en fonction du temps ($\frac{d(\Delta m_t / \Delta m_\infty)}{dt} = f(t)$). Comme la QCM enregistre un point toutes les 0,1 seconde, pour pouvoir faire la dérivée correctement, nous extrapolons la courbe de masse avec une courbe de soixante points. Nous obtenons la série de courbes de vitesses relatives selon la figure 4.13.

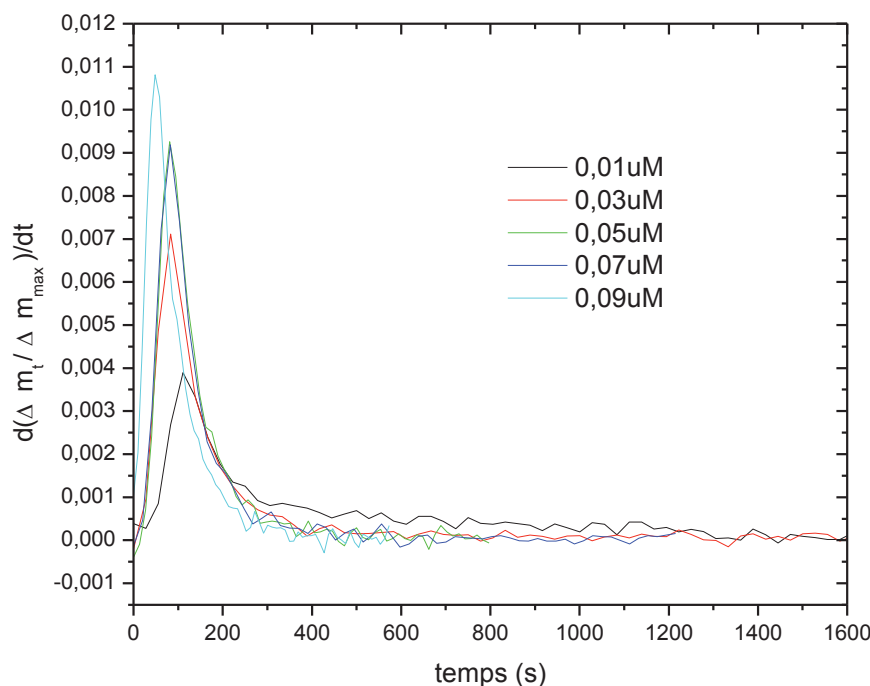
FIGURE 4.12 – **Suivi cinétique par la microbalance à cristal de quartz suite à l'injection d'une série de différentes concentrations en MOS1 bactérien (0,01 0,03 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



Nous constatons que la vitesse augmente rapidement jusqu'à un maximum, cette première phase correspond à l'état pré-stationnaire (Δt_1). A partir du maximum, nous avons une décroissance de la vitesse relative, la vitesse relative maximale correspondra à la vitesse initiale de la réaction enzymatique. La décroissance de la vitesse est significative du mécanisme réactionnel enzymatique.

A partir de ces deux séries de courbe, il est difficile de déterminer un mécanisme général réactionnel. En effet, le suivi de la masse relative comportant une forme sigmoïdale peut correspondre à différents types de mécanismes cinétiques. Parmi ces mécanismes, nous retrouvons les systèmes auto-catalytiques ou encore comportant un intermédiaire réactionnel. Cependant, nous nous trouvons dans un mécanisme faisant intervenir une protéine, nous pouvons alors supposer que l'association se passe selon un équilibre cinétique (avec $K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ la constante de dissociation ou encore $K_a = \frac{1}{K_d}$ la constante

FIGURE 4.13 – **Vitesse relative de la prise de masse (normalisée) suite à l'injection d'une série de différentes concentrations en MOS1 bactérien (0,01 0,03 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



d'association) entre la forme complexée et la forme libre (en considérant que la protéine se trouve dans une forme dimérique) :



Dans ce cas, nous nous retrouvons dans la première partie d'un mécanisme réactionnel de type Michaelis-Menten, dont le mécanisme général est le suivant :



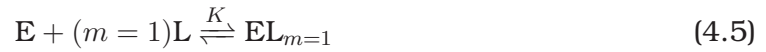
Son traitement cinétique nous permet d'obtenir l'équation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat (équation de Michaelis-Menten) :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (4.3)$$

Dans la plupart des cas, pour représenter l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration, nous utilisons la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale en substrat. Ainsi, nous pouvons réécrire l'équation de la façon suivante :

$$v_0 = \frac{V_{max}^{app}[S]_0}{K_m^{app} + [S]_0} \quad (4.4)$$

Dans notre cas, nous nous trouvons uniquement sur le premier équilibre de la réaction enzymatique, car à priori nous n'avons pas de coupure de l'ADNdb par l'enzyme du fait de la rigidité imposée par la forme linéaire du double brin d'ADN. Dans le cas d'un simple équilibre, nous pouvons alors faire le parallèle avec les systèmes enzymes-ligands. En effet, si nous considérons que l'ITR est un ligand et que l'enzyme possède un (ou plusieurs) site(s) de liaison(s) à celui-ci, nous pouvons alors considérer l'équilibre suivant, pour un seul site de fixation avec le ligand :



Dans ce cas, la constante K représente la constante individuelle de dissociation du ligand L pour son site de fixation, qui correspond donc à la première partie de l'équation de Michaelis-Menten. K peut alors s'écrire de la façon suivante :

$$K = \frac{[E][L]_{libre}}{[EL]} \quad (4.6)$$

La saturation du site de fixation peut être définie par le rapport suivant :

$$Y = \frac{[EL]}{[E] + [EL]} \quad (4.7)$$

Ainsi, en introduisant l'équation 4.6 dans l'équation 4.7, nous pouvons exprimer Y en fonction de la concentration en ligand libre :

$$Y = \frac{[L]_{libre}/K}{1 + [L]_{libre}/K} = \frac{[L]_{libre}}{K + [L]_{libre}} \quad (4.8)$$

Dans le cas où il existe un seul site de fixation de L sur E (m = 1), alors $[L]_{fix}$ correspond à la fraction saturée de la protéine, Y, multipliée par la concentra-

tion totale de la protéine $[E]_0$:

$$[L]_{fixe} = Y[E]_0 \quad (4.9)$$

et l'équilibre de fixation peut être exprimé en fonction des concentrations de ligand sous forme libre et sous forme fixée :

$$\frac{[L]_{fixe}}{[L]_{libre}} = \frac{[E]_0}{K} - \frac{[L]_{fixe}}{K} \quad (4.10)$$

$$[L]_{fixe} = (m = 1) \frac{[E]_0 [L]_{libre}}{K + [L]_{libre}} \quad (4.11)$$

Alors, si nous multiplions l'ensemble de l'équation par une constante de vitesse nous retrouvons l'équation de la vitesse suivante :

$$k_0 [L]_{fixe} = k_0 (m = 1) \frac{[E]_0 [L]_{libre}}{K + [L]_{libre}} \quad (4.12)$$

$$v = (m = 1) \frac{V_{max} [L]_{libre}}{K + [L]_{libre}} \quad (4.13)$$

et en considérant les conditions initiales nous obtenons comme dans le cas de l'équation de Michaelis-Menten la vitesse initiale suivante :

$$v_0 = (m = 1) \frac{V_{max}^{app} [L]_{libre(t=0)}}{K^{app} + [L]_{libre(t=0)}} \quad (4.14)$$

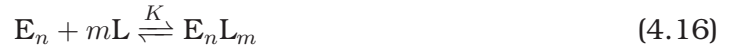
Nous constatons (au sein de cette équation) que si plusieurs ITR devaient se fixer à une protéine, cela impacterait uniquement un facteur multiplicatif de l'équation de Michaelis-Menten (m différent de 1).

Cependant, il existe des cas plus compliqués, c'est le cas des protéines où il existe plusieurs protéomères, c'est-à-dire plusieurs zones au sein d'une même protéine pouvant se fixer à un ou plusieurs ligands. Nous parlons également pour ce type de protéine de "coopérativité" ou encore de "phénomènes allostériques". Le premier cas à avoir été étudié, est celui de l'hémoglobine qui possède quatre sites de liaisons à l'oxygène. Ce cas a été étudié par Hill, dont l'équation porte le nom :

$$Y = Y_{max} \frac{X^n}{K_{50}^n + X^n} \quad (4.15)$$

Cette équation permet de décrire les phénomènes d'équilibre qui peuvent exister au sein même d'une protéine *via* le facteur dit de Hill n (parfois nommé

h), qui peut être introduit dans le mécanisme global de la réaction de la façon suivante :



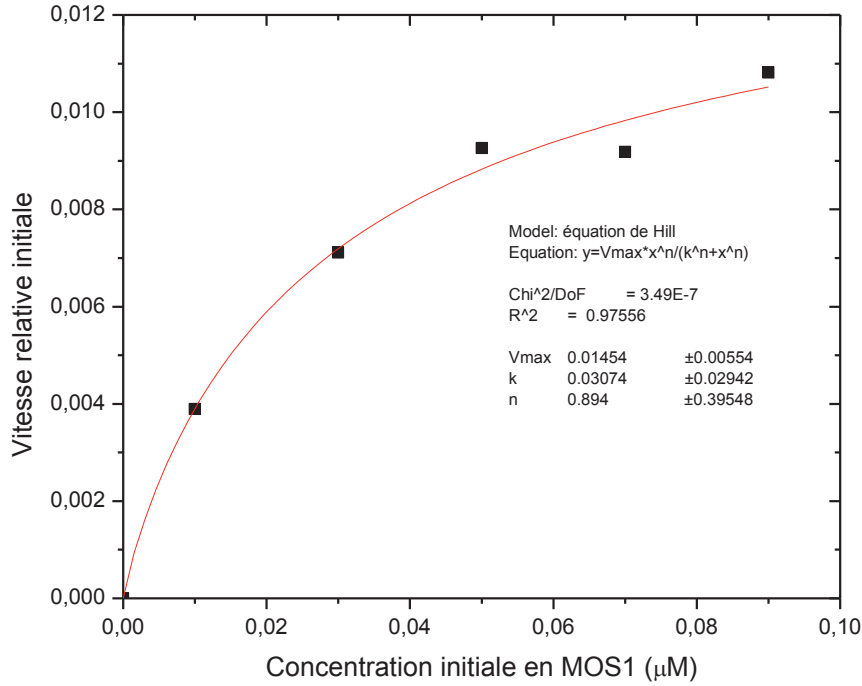
On peut ainsi retrouver l'équation de la vitesse initiale à partir de l'équation 4.14 et de l'équation 4.15. L'équation générale décrit la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en ligand :

$$v_0 = (m = 1) \frac{V_{max}^{app} [L]_{libre(t=0)}^n}{K_{50}^n + [L]_{libre(t=0)}^n} \quad (4.17)$$

Dans notre cas, nous faisons varier la concentration initiale en protéine et non en ITR (le ligand ou substrat). En considérant uniquement les concentrations initiales et en tenant compte du fait que la vitesse que nous mesurons vient de la dérivée d'une prise de masse et donc de fixation (ou de formation de complexe à l'état initial), cela revient à parler de la coopérativité (ou de non coopérativité) de la formation du complexe. Nous pourrions alors, pour chaque étude tracer la vitesse relative initiale, en fonction de la variable initiale c'est-à-dire la concentration initiale en protéine injectée dans la solution. Nous pourrions ensuite y appliquer l'équation de Hill.

Pour notre premier système d'étude, nous pouvons alors reporter la vitesse relative considérée comme initiale en fonction de la concentration initiale en MOS1 bactérien injectée, figure 4.14. Travaillant en vitesse relative et faisant évoluer uniquement la concentration initiale en protéine, nous ne pouvons pas conclure sur le facteur m et donc le nombre d'ITR utilisés dans la réaction. Seulement, comme nous ne constatons pas de phénomènes de coupure nous pouvons supposer que le complexe comportant deux ITR ne se forme pas. Et ce car il a été montré qu'à partir du moment que le complexe synaptique se forme, cela conduit rapidement vers la coupure de l'ADNdb. En revanche, nous pouvons remarquer que nous obtenons *via* l'équation de Hill un coefficient n de $0,89 \pm 0,39$. Ce coefficient nous permet d'en conclure que la réaction est non coopérative et donc de type Michaelis-Menten. Dans ce cas, nous pouvons considérer la réaction enzymatique est un simple équilibre (équation 4.1) et y appliquer l'équation permettant de décrire l'évolution de la concentration en

FIGURE 4.14 – **Report de la vitesse relative initiale (carré noir) en fonction des différentes concentrations en MOS1 bactérien (0,01 0,03 0,05 0,07 et 0,09 μM); application de l'équation de Hill (courbe rouge) à l'ensemble des points**



complexe sur la surface (forme intégrée de l'équation de vitesse) :



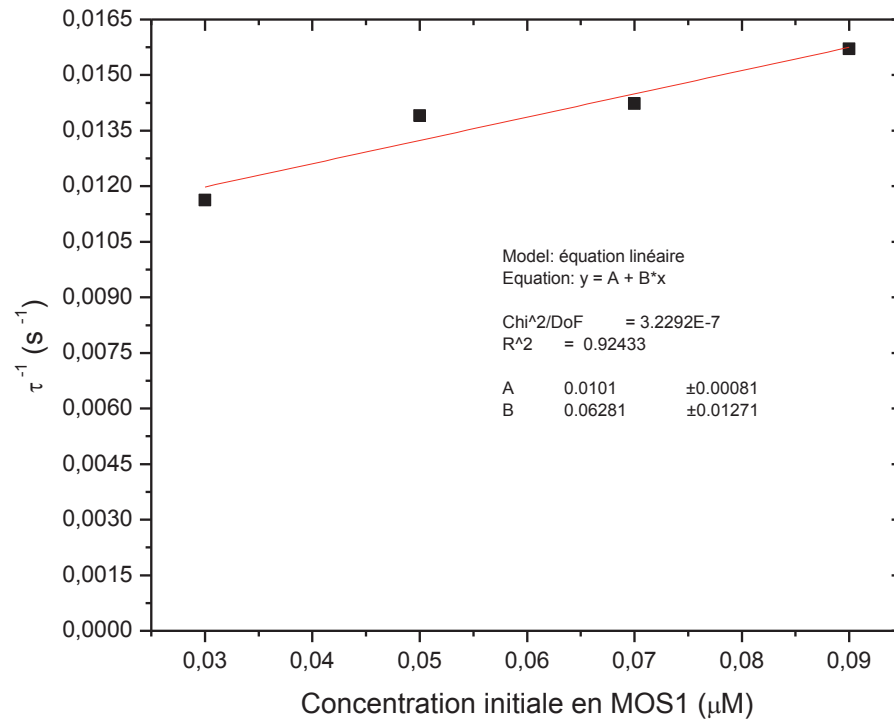
$$[(\text{MBPMos})_2/\text{ITR}]_t = [(\text{MBPMos})_2/\text{ITR}]_{\infty} (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (4.19)$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{\infty} (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (4.20)$$

Celle-ci nous permettra alors, pour chaque valeur de τ obtenue, de tracer l'équation de $\tau^{-1} = k_{\text{on}}[(\text{MBPMos})_2]_0 + k_{\text{off}}$ pour chaque concentration initiale en protéine, et ainsi de déduire les constantes de vitesses d'association et de dissociation de la réaction. Remarque : nous ne considérons pas dans l'analyse suivante (contrairement à celle sur la vitesse initiale) le premier suivi cinétique (0,01 μM) du fait que nous ne nous trouvons pas tout à fait dans un état stationnaire sur l'ensemble de la courbe. Ainsi, pour chaque valeur

de τ correspondant à une valeur de la concentration initiale en protéine nous pouvons reporter la figure 4.15. Il ressort de la figure 4.15 l'équation $\tau^{-1} =$

FIGURE 4.15 – **Report des différentes valeurs de τ^{-1} pour chaque concentration en MBP-Mos bactérien (0,01 0,03, 0,05 0,07 et 0,09 μM); application d'une équation linéaire**



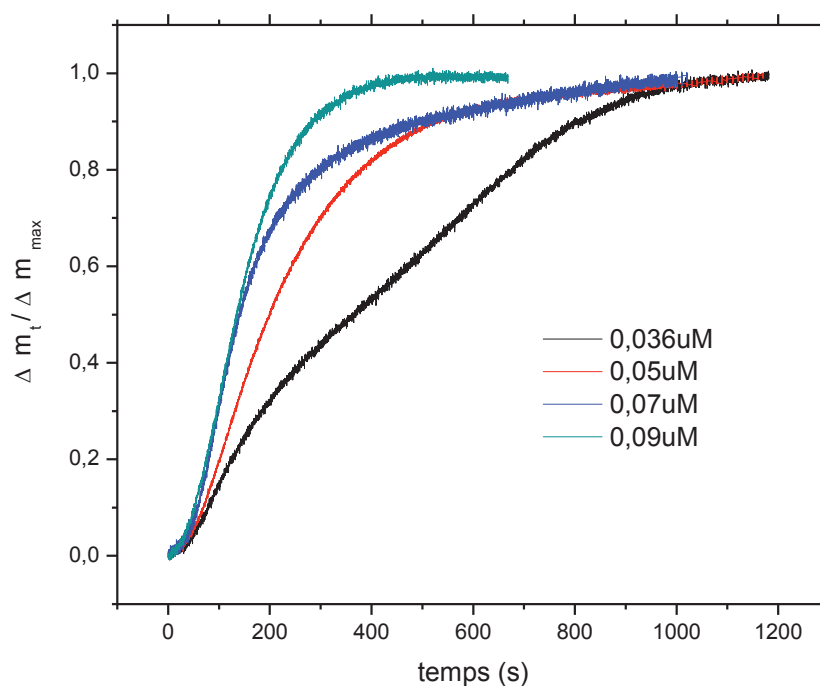
$0,063[(MBPMos)_2]_0 + 0,010$ avec donc $k_{on} = 0,063\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ et $k_{off} = 0,010\text{s}^{-1}$. Nous en déduisons alors la constante de dissociation de la réaction enzymatique $K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = 0,158\mu\text{M} = 158\text{nM}$ ou encore la constante d'association $K_a = \frac{1}{K_d} = 6,3\mu\text{M}^{-1}$. Ces valeurs de constantes sont de l'ordre de grandeur de ce que nous pouvions attendre pour une protéine possédant un site de fixation spécifique à l'ADNdb (en comparaison de ce qui a pu être obtenue pour la polymérase KF sur cristal de quartz). [62]

4.2.2 Etude cinétique et mécanistique de l'étape de complexation de MOS1 avec ses ITR - Utilisation de la protéine MOS1 produite en système eucaryote

Etude cinétique par la Microbalance à Cristal de Quartz

Par comparaison à la protéine précédente, nous avons également effectué une étude cinétique pour la même protéine, mais produite en système eucaryote. La figure 4.16 représente le suivi de la masse normalisée pour différentes concentrations (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM). La première chose que

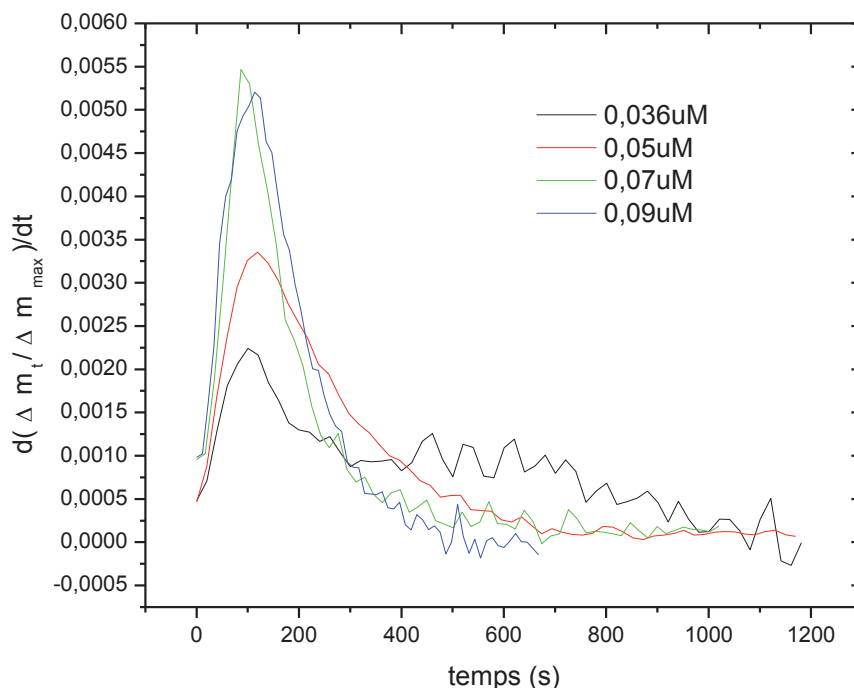
FIGURE 4.16 – **Suivi cinétique par la microbalance à cristal de quartz suite à l'injection d'une série de différentes concentrations en MOS1 eucaryote (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



nous pouvons constater à travers ce suivi cinétique par la QCM, comparative-ment à la précédente étude, est que la cinétique globale semble plus lente, mais plus linéaire. De plus, nous n'avons pas pu obtenir de prise de masse pour la concentration de 0,01 μM contrairement à l'étude précédente. Pour pouvoir rendre compte de la cinétique, nous procédons avec les mêmes opérations ma-

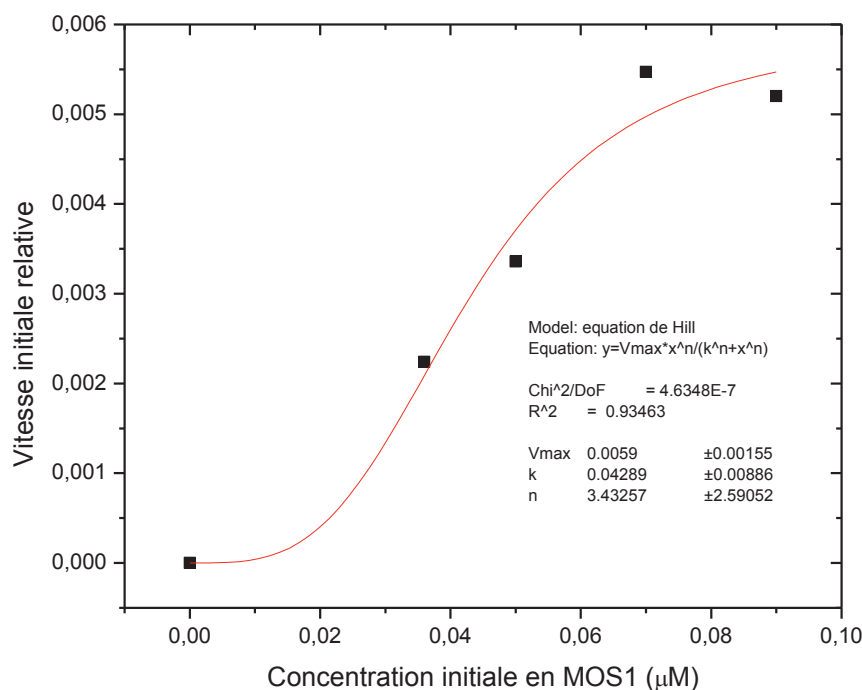
thématiques. Ainsi, chacune des courbes est extrapolée avec soixante points pour permettre d'effectuer aisément la dérivé et obtenir alors la vitesse relative en fonction du temps (cf. figure 4.17). Cette méthodologie nous permet alors de

FIGURE 4.17 – **Vitesse relative de la prise de masse (normalisée) suite à l'injection d'une série de différentes concentrations en MOS1 eucaryote (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



reporter la vitesse relative considérée comme initiale selon le même schéma que la section précédente, figure 4.18. Ainsi, la figure reportant la vitesse initiale relative en fonction de la concentration initiale en protéine, nous montre que celle-ci ne possède pas un comportement de type Michaelis-Menten. En effet, si nous appliquons l'équation de Hill, nous obtenons un coefficient n de 3,4. Nous pouvons donc conclure, que la réaction ne s'effectue pas selon un simple équilibre, mais selon un système coopératif. La coopérativité de la réaction implique que plusieurs zones de la protéine interagissent durant la réaction. De plus, chaque zone réagit selon son propre équilibre pour donner un complexe final unique. Nous pouvons supposer qu'au sein de MOS1, il existe plusieurs zones pouvant interagir avec l'ITR (ADNdb). Si nous reprenons la structure de

FIGURE 4.18 – **Report de la vitesse relative initiale en fonction des différentes concentrations en MOS1 eucaryote (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



la protéine, les motifs décrivant la forme HTH nous suggèrent qu'il existe deux domaines de liaison à l'ADN *via* les structures en hélices α . Nous pouvons également supposer que le site catalytique participe à la liaison de l'ADNdb même si cela n'est pas complètement décrit dans la structure cristallographique obtenue par Richardson *et al.*. Enfin, nous pouvons noter que selon la courbe de Hill, pour une concentration de 0,01 μM , la vitesse relative initiale est quasiment nulle. Ce résultat vient expliciter la raison pour laquelle nous n'avons pas eu de prise de masse pour cette concentration initiale en protéine.

Même si nous ne pouvons pas affirmer le nombre de sites participants à la liaison à l'ITR, nous pouvons néanmoins supposer qu'il existe bien plusieurs sites participants à la liaison du fait que la coopérativité est non négligeable ($n = 3, 4$). La coopérativité implique qu'il existe pour chaque site de liaison un équilibre thermodynamique qui impacte sur la cinétique globale de la réaction. De nombreuses études existent sur le détail des différents équilibres

qui peuvent exister entre les différents sites d'interactions au sein d'une protéine. Seulement, les modèles restent difficiles à mettre en oeuvre. Nous pouvons néanmoins, dans un premier temps, simplifier le mécanisme en un plus général qui reprend l'équilibre global de la réaction en faisant intervenir des constantes de vitesses apparentes :



Nous pouvons à partir de cet équilibre appliquer les équations sur la masse que nous avons pu obtenir précédemment dans la section 4.2.1 en ajustant, les constantes de vitesses :

$$[((MBPMos)_2)_n / ITR]_t = [((MBPMos)_2)_n / ITR]_\infty (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (4.22)$$

$$\Delta m_t = \Delta m_\infty (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (4.23)$$

$$\tau^{-1} = k_{on}^{app} [((MBPMos)_2)_n]_0 + k_{off}^{app} \quad (4.24)$$

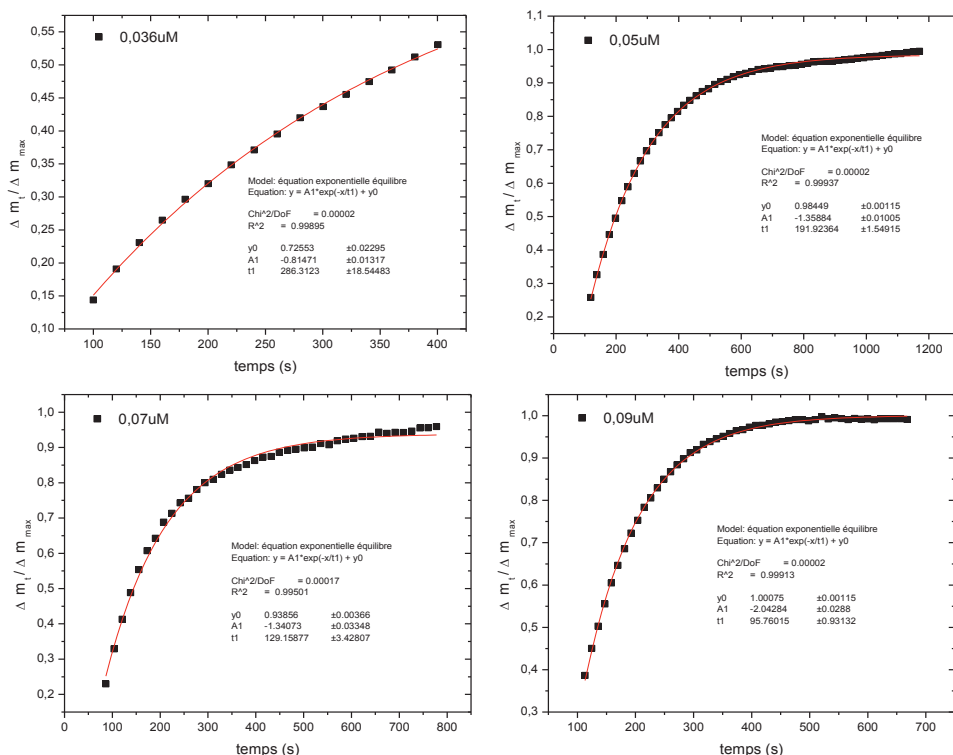
Les constantes de vitesses apparentes sont alors des combinaisons linéaires des différentes constantes de vitesses propres à chaque équilibre que nous pouvons exprimer de la façon suivante :

$$k_{on}^{app} = \sum_{i=1}^n k_{+i} \quad (4.25)$$

$$k_{off}^{app} = \sum_{i=1}^n k_{-i} \quad (4.26)$$

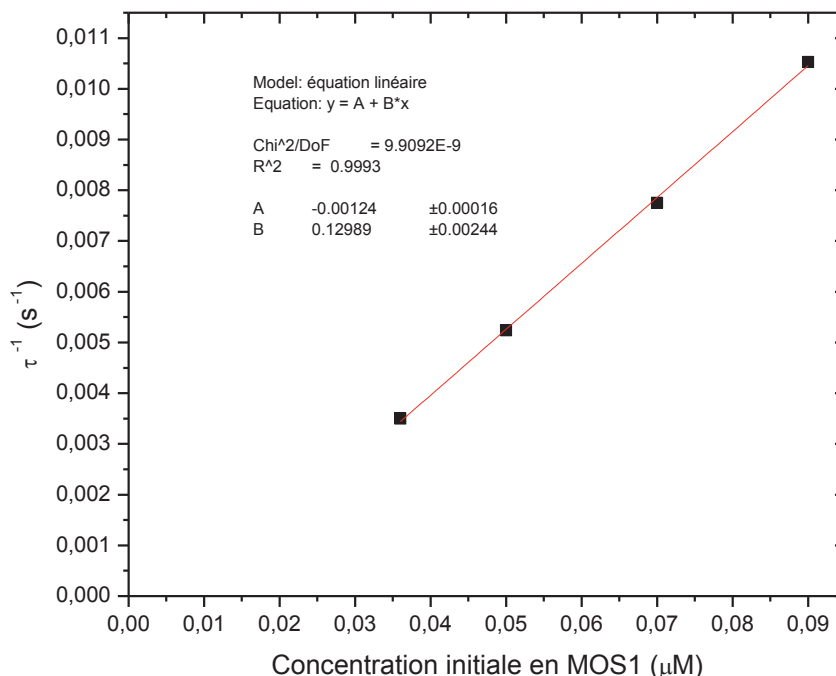
Ainsi, à partir des équations 4.24 et 4.24 nous traçons les différentes figures 4.19 et 4.20. Il ressort de la figure 4.15, l'équation $\tau^{-1} = 0,130 [((MBPMos)_2)_n]_0 - 0,001$ avec donc $k_{on}^{app} = 0,130 s^{-1} \mu M^{-1}$ et $k_{off}^{app} = -0,001 s^{-1}$. Nous pouvons voir que nous obtenons une valeur négative pour la constante de vitesse de dissociation k_{off}^{app} , ce qui nous empêche de calculer les constantes apparentes d'associations et de dissociations K_a^{app} et K_d^{app} . Toutefois la valeur k_{off}^{app} est négative et donc incohérente vis-à-vis de la théorie. Même si nous ne pouvons pas statuer sur la constante de vitesse apparente de dissociation (problème venant probablement du modèle cinétique utilisé), nous pouvons néanmoins statuer sur la constante de vitesse apparente d'association. En effet, du fait d'un bon coefficient de régression sur la courbe et donc sur la pente de la courbe, nous

FIGURE 4.19 – **Application de l'équation 4.23 pour les différents suivis de la masse relative pour chaque concentration en MOS1 eucaryote (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM)**



pouvons admettre que la constante de vitesse apparente d'association est en accord avec la réaction. De plus, nous pouvons remarquer que la valeur de la constante de vitesse apparente d'association est beaucoup plus élevée que pour la protéine venant d'un système bactérien (environ 2 fois plus importante). Ce facteur 2 entre les deux constantes de vitesses d'association apparente provient probablement de la coopérativité du système qui tend à rendre plus efficace l'association de la protéine. Le fait d'avoir plusieurs domaines de la protéine qui interagissent avec l'ITR augmente la spécificité de la liaison à l'ADNdb (à l'ITR), ce qui se traduit donc par une augmentation de la constante de vitesse d'association k_{on}^{app} . Et tend donc à éliminer la constante de dissociation.

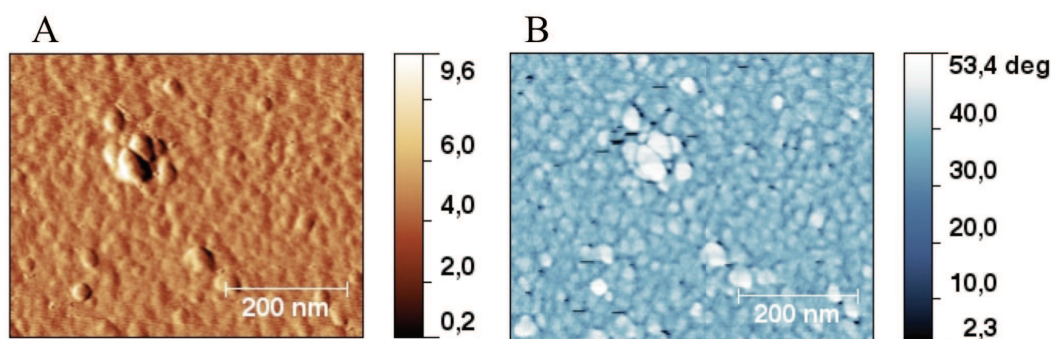
FIGURE 4.20 – **Repport des différentes valeurs de τ^{-1} pour chaque concentration en MOS1 eucaryote (0,036 0,05 0,07 et 0,09 μM); application d'une équation linéaire**



Mise en évidence du complexe MBPMOS1/ANDdb par Microscopie à Force Atomique

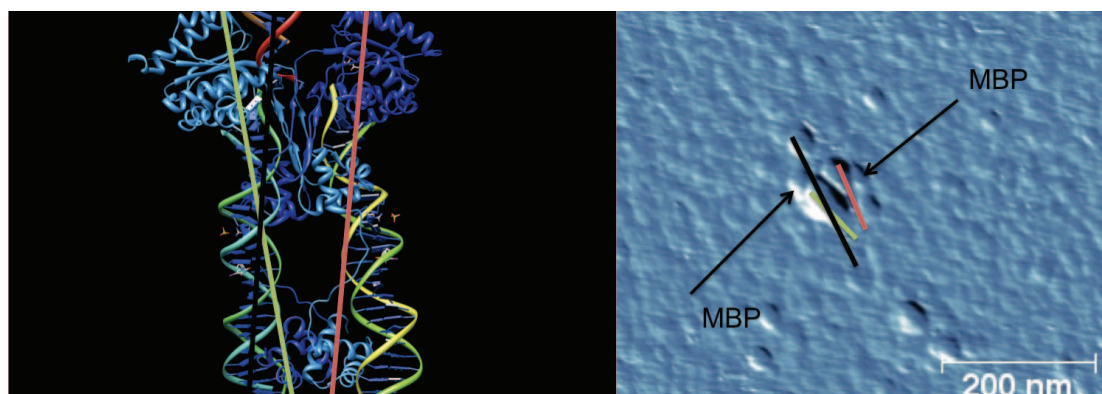
Pour valider la formation du complexe protéique MOS1/ADNdb, nous avons, à partir d'une surface de chrome possédant une très faible rugosité (rms inférieur à 0,2 nm) visualisé la forme d'un complexe protéique. Pour ce faire, la surface de chrome est modifiée selon la procédure décrite dans le chapitre 2. A celle-ci, nous avons additionné la séquence d'ADNdb contenant les séquences ITR spécifique de MOS1. Puis, nous avons enregistré des images en topographie et en phase de la surface après réaction avec la protéine MOS1 eucaryote (cf. figure 4.21). Même s'il reste difficile de visualiser l'ADN, lorsque nous y additionnons une protéine, nous ajoutons du poids à l'ADN se qui le "fixe" à la surface. Nous pouvons alors voir sur la figure 4.21 la présence de l'ADNdb (présentant une forme légèrement hélicoïdale) aux extrémités de la protéine. De plus, sur l'image de la protéine, nous pouvons voir que celle-ci est consti-

FIGURE 4.21 – **Visualisation par AFM d'une surface de chrome après modification par un double brin d'ADN contenant les ITR de MOS1 et après réaction avec MOS1 eucaryote, A : image selon la topographie ; B : image selon la phase**



tuée de plusieurs parties. Or, nous savons que la forme privilégiée est la forme dimérique, ce qui implique une forme proche de la symétrie axiale selon le brin d'ADNdb. De plus, chaque monomère est fusionné à une protéine de fusion MBP (nécessaire pour la stabilité de MOS1 et de lors de sa production pour la phase de purification, mais n'interagissant pas avec l'ADN) de taille équivalente à MOS1. Ceci peut nous laisser envisager une forme comportant quatre unités protéiques. Ainsi, si nous considérons que l'ADNdb passe au milieu du complexe protéique, nous pouvons faire le parallèle avec la cristallographie obtenue par Richardson *et al.* et attribuer les différentes parties du complexe protéique. D'après la cristallographie, nous pouvons donc supposer que les deux monomères de MOS1 se trouvent complexés entre eux et que les MBP se trouvent écartées du complexe central. C'est précisément cette structure que nous voyons dans la figure 4.22. Les parties protéiques, dans le plan inférieur de l'image, se trouvent écartées vers l'extérieur de l'ADNdb contrairement aux parties du plan supérieur. Nous pouvons donc supposer que les deux parties du plan supérieur sont collées l'une à l'autre et correspondent aux deux monomères de MOS1. Dans ce cas, les parties du plan inférieur peuvent être attribuées aux protéines de fusions MBP. De plus en comparant les orientations du complexe, nous pouvons voir que la partie du complexe en haut de l'image s'écarte légèrement de l'ADNdb contrairement à la partie du bas de l'image qui a tendance à être de taille plus petite et plus reserrée

FIGURE 4.22 – **Comparaison entre l'image obtenue par AFM et la cristallographie de MOS1/ADNdb obtenue par Richardson et al.,[153] attribution des parties MBP et MOS1**



vers l'ADNdb. Ces constats nous laissent supposer que la partie supérieure attribuée à MOS1 correspond au domaine catalytique de la protéine et que la partie inférieure correspond à l'enchaînement des deux domaines de liaisons à l'ADNdb nommés par HTH.

4.3 Conclusion du Chapitre 4

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en avant l'interaction d'une protéine MOS1 avec une séquence d'ADN double brin. Notre système d'étude est ainsi validé, y compris pour l'étude de l'interaction ADNdb / protéine, lorsque la protéine réagit selon un équilibre spécifique à une zone de l'ADNdb.

Ainsi, à travers cette étude, nous avons pu faire la différence entre deux types de productions d'une même protéine. Cette différence s'est fondée sur l'application de l'équation de Hill. Nous avons pu mettre en avant la coopérativité ou non lors d'une réaction de complexation entre une protéine et l'ADNdb. Nous retrouvons alors, pour la protéine MOS1 produite en système bactérien, un système non-coopératif ($n = 0,89$). Tandis que, pour la protéine MOS1 produite en système eucaryote, nous avons obtenu un système coopératif ($n = 3,4$).

Dans le cas du système coopératif, nous avons également montré, en usant de l'équation de Hill, pourquoi nous n'avons pas eu de réaction de complexation pour la concentration de 0,01 μM (vitesse relative initiale quasiment nulle). Par la suite, dans les deux cas, nous avons pu appliquer un modèle cinétique permettant de modéliser les données expérimentales. Nous avons ainsi pu en ressortir les différentes constantes de vitesses des réactions invoquées (τ , k_{on} et k_{off} , dont les valeurs sont résumées dans le tableau 4.2). La Microscopie à Force Atomique nous a enfin permis de montrer que le complexe MOS1 / ADNdb se forme bien selon un dimère de la protéine.

TABLE 4.2 – **Report des différentes constantes de vitesses obtenues par la modélisation**

MOS1 - Bactérien / Eucaryote	[MOS1] ₀ (μM)	τ (s)	r^2
Bactérien $k_{on}[MOS1]_0 + k_{off}$ $= 0,063[MOS1]_0 + 0,010$	0,03	86,0	0,997
	0,05	71,9	0,998
	0,07	70,3	0,996
	0,09	63,7	0,999
Eucaryote $k_{on}^{app}[MOS1]_0 + k_{off}^{app}$ $= 0,129[MOS1]_0 - 0,0012$	0,03	286,3	0,998
	0,05	191,9	0,999
	0,07	129,1	0,995
	0,09	95,7	0,999

Même s'il est difficile de conclure sur le nombre de sites invoqués dans le cas d'un système coopératif, il serait intéressant de voir l'impact sur le coefficient de Hill causé par des mutants de la protéine MOS1. Pour ce faire, nous pourrions utiliser un mutant dont le système catalytique est absent de la protéine. Nous verrions ainsi l'impact sur le coefficient de Hill avec un coefficient n alors inférieur à 3 (on peut supposer $n = 2$).

Conclusion Générale

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre au point un dispositif de type biocapteur permettant l'étude de l'interaction ADN / Protéine. Nous avons particulièrement ciblé nos investigations sur deux types de protéines impliquées dans les mécanismes de recombinaison de l'ADN (HsRad51 et MOS1)

Afin de réaliser un dispositif permettant des analyses d'événements biologiques de surface. Nous avons dans un premier temps développé une méthode de modification de surface par voie électrochimique, permettant l'élaboration d'une couche organique de surface. L'originalité de la méthodologie réside dans la nature de la fonction d'ancrage chlorure de sulfonyle associée à cette couche organique. La méthodologie de modification consiste en la réduction électrochimique d'un sel d'aryldiazonium formé *in situ* à partir de l'acide sulfanilique ($\text{H}_2\text{N-Ar-SO}_3\text{H}$). La réaction clef du mécanisme réside dans l'obtention d'un radical aryle sur des surfaces variées, conduisant à la formation d'une liaison covalente stable. Une modification chimique, par PCl_5 , permet facilement la formation de la fonction d'ancrage. Les différentes techniques de caractérisations utilisées (Voltampérométrie cyclique, QCM, XPS et AFM) ont permis de mettre en évidence les différentes étapes de modifications. Ainsi, par voltampérométrie cyclique, nous avons pu montrer que la couche organique était formée de manière homogène (effet bloquant du transfert électronique). En outre, nous avons aussi pu mettre en évidence les changements d'état de la surface (passage à la forme active de la fonction d'ancrage). Par analyse QCM, nous avons démontré que la couche organique représente une très faible masse sur la surface, ce qui représente un des points importants pour la mesure des interactions ADN / protéine. Les analyses XPS ont par la suite, pu confirmer la présence des différents éléments chimiques constituant la couche organique (C, O, S, Cl). De surcroît, les analyses AFM ont montré que la couche organique

adoptait parfaitement la rugosité de la surface supportant la modification. A titre d'exemple, dans le cas d'une surface de chrome, la rugosité de base de 0,2 nm est ainsi conservée après le dépôt de la couche organique. Une méthodologie dite de "scratching" a été particulièrement utilisée afin de mesurer la hauteur de marche entre la surface de chrome et la couche organique. Cette hauteur de marche, d'environ 0,8 nm, correspond à la hauteur d'une seule couche organique. Confirmant ainsi le contrôle de la réaction de modification de surface par cette voie électrochimique.

L'immobilisation d'ADN simple ou double brins a pu par la suite être réalisée rapidement sans qu'aucune modification préalable soit nécessaire. Cette méthode présente une avancée certaine dans le domaine des biocapteurs puisque, la possibilité d'immobiliser directement des ADN, ouvre le dispositif à des substrats directement issus de productions biologiques.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un ADNsb et mesuré par couplage QCM / AFM, les interactions possible avec la protéine HsRad51. Cette interaction a été mesuré en temps réel, ce qui a permis de définir un modèle cinétique pour la formation du nucléo-filament protéique. Dans ce cadre, l'AFM a permis de visualiser les complexes nucléo-protéiques, confirmant les hypothèses formulées par le modèle cinétique. Ces études ont été réalisées en faisant varier les conditions initiales de l'introduction de la protéine vis-à-vis de l'ADNsb et du co-facteur introduit à la réaction. Enfin l'étude cinétique de la formation du filament nucléo-protéique de HsRad51 en présence d'un inhibiteur peptidique, le BRC4-28, a été effectuée selon la même approche. Les résultats obtenus confirment les hypothèses avancées par la littérature.

Afin, de valider notre système d'étude pour la mesure de l'interaction entre une protéine et une séquence spécifique d'ADNdb, nous avons utilisé une autre protéine, la transposase MOS1. En effet, cette protéine forme un complexe spécifique à une séquence d'ADNdb donnée. De la même manière que celle effectuée précédemment nous avons immobilisé un ADNdb, et soumis cette surface à l'action de la protéine MOS1. Nous avons, de façon similaire à ce qui a été réalisé pour HsRad51, développé un modèle cinétique répondant aux courbes expérimentales obtenues pour deux productions différentes de MOS1. Nous avons ainsi, pu montrer la différence de réactivité entre les deux sources de production de la protéine. Nous avons également, démontré qu'il était pos-

sible d'envisager d'accéder au nombre de sites de fixation de la protéine avec l'ADNdb (application de l'équation de Hill et visualisation AFM).

L'ensemble de ces études cinétiques préliminaires, nous laisse envisager une multitude de possibilités quant à la résolution de mécanismes biologiques plus complexes. A titre d'exemple, nous pourrions ainsi envisager accéder à la cinétique de la catalyse de la coupure de l'ADNdb par la protéine MOS1.

Plusieurs études cinétiques restent à être effectuée pour différentes températures de réaction, afin, d'évaluer les énergies d'activation conduisant à la formation des complexes nucléo-protéique.

Annexe 1 - Matériels et Méthodes Biologiques

Production d'ADN - PCR asymétrique

Amplification asymétrique pour l'obtention des séquences utilisées dans le chapitre 3

Les brins simples de 1707 bases utilisés comme séquences cibles ont été obtenus à partir de brins doubles de même taille par PCR asymétrique. Le simple brin 1707-mer est produit à partir d'une séquence ADN d'un élément transposable mariner (numéro d'accès AJ496134) cloné dans un plasmide (fragment d'ADN circulaire d'origine bactérienne) pGEM-T easy (Promega) (Figure 4.23) introduit dans des bactéries JM 109.

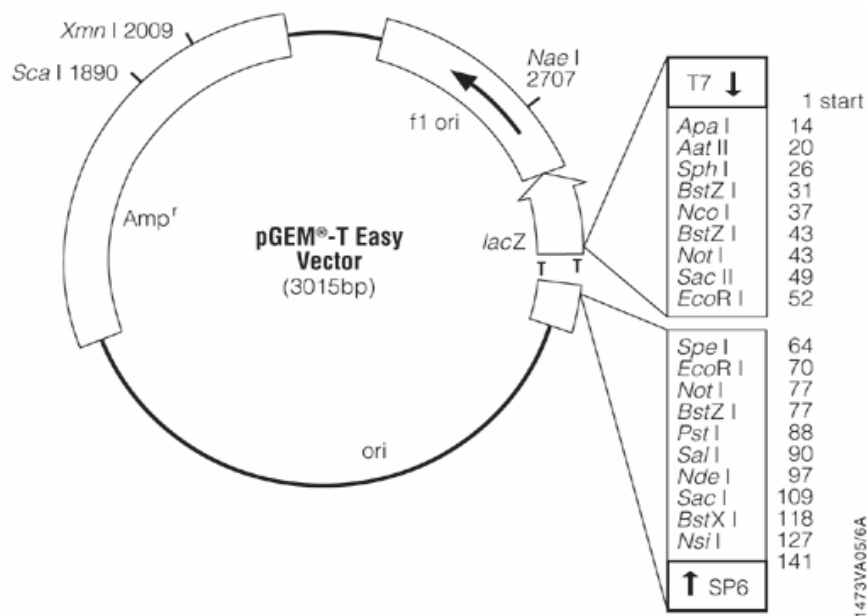
On sélectionne par la suite, des amorces pour effectuer la PCR asymétrique pour obtenir une séquence d'ADN simple brin. La séquence et les amorces utilisées sont reportées dans la figure 4.24.

La technique de PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la fraction d'ADN d'intérêt. De plus, en jouant sur le ratio d'amorces introduit, il est possible d'amplifier spécifiquement une seule séquence et donc d'obtenir principalement une séquence d'ADN simple brin.

La réaction se déroule dans un microtube de 0,2 mL. Le milieu réactionnel contient :

- 100 ng du fragment d'ADN,
- 3 μ L de $MgCl_2$ à 25 mM,

FIGURE 4.23 – **Schéma du plasmide pGEM-T**



- 3,7 μ L de dNTP à 2 mM,
- 1 μ L d'amorce (5') CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG (3') à 25 μ M,
- 1 μ L d'amorce (5') TCA CTC ATT AGG CAC CCC AGG (3') à 1 μ M,
- 1 unité de Taq polymérase (Promega),
- 5 μ L de tampon de réaction de la Taq polymérase (50 mM Tris-HCL (pH 8 à 25 °C), 50 mM KCL et 0,1% Triton X-100).
- Le volume final est ajusté à 50 μ L avec de l'eau ultra pure.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur « Mastercycler personal » (Eppendorf). Les conditions de PCR sont les suivantes : une première étape de dénaturation à 94 °C, 40 cycles de : dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, hybridation à 59 °C pendant 1 min ; élongation à 72 °C pendant 1 min. A l'issue des 40 cycles, une extension de 5 min à 72 °C est effectuée. Dans un tube témoin négatif, l'ADN matrice est remplacé par de l'eau ultra pure. Le résultat attendu de la PCR dans ce tube est une absence d'amplification.

Pour vérifier la qualité et la quantité d'ADN obtenu par PCR, une fraction de celui-ci est déposée sur un gel d'électrophorèse. Une électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Les fragments les plus longs migrent moins loin que les petits. Un marqueur de taille dont la longueur des fragments est connue permet d'estimer la taille de l'ADN extrait. Le marqueur utilisé ici est « Generuler Ladder Plus » (Fermentas), il correspond à une échelle adaptée pour estimer la taille des fragments.

Les électrophorèses de contrôle sont effectuées sur un gel composé d'agarose (1%), de tampon de migration TAE 1X (Tris Acétate 40 mM - EDTA 1 mM, pH 8) et de bromure d'éthidium (BET, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce dernier s'intercale entre les bases de l'ADN et émet de la fluorescence sous irradiation en lumière ultraviolette ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ce qui permet l'observation des fragments.

Amplification asymétrique pour l'obtention des séquences doubles brins utilisées dans le chapitre 4

Pour produire l'ADNdb, nous sommes partis de deux PCR asymétriques, pour produire séparément deux ADNsb complémentaires, tout en laissant sur la position 3' finale une courte séquence d'acides nucléiques de 98 bases pour permettre l'immobilisation.

A partir de la séquence présentée dans la figure 4.25, dans laquelle, le vert correspond à l'amorce nommée Mos-1, le violet foncé correspond à l'amorce Mos-2 et le rouge à Mos-3. De façon équivalente à la production précédente, nous avons d'une part couplé les amorces Mos-1 (1 pmol) à Mos-3 (25 pmol) pour produire préférentiellement le brin qui servira à l'immobilisation. D'une autre part, nous avons mélangé les amorces Mos-2 (25 pmol) et Mos-3 (1 pmol) pour produire le brin complémentaire qui comporte 98 acides nucléiques en moins par rapport à l'autre brin.

Après vérification des tailles par électrophorèse, nous avons mélangé les deux productions. Le mélange est porté à ébullition pendant 2 minutes, puis est laissé refroidir jusqu'à température ambiante, pour permettre l'hybridation des deux brins d'ADN complémentaires.

FIGURE 4.24 – **Séquence utilisée pour l'amplification de simple brin d'ADN. En rouge, la séquence correspondant au plasmide. En noir, la séquence correspondant au transposon Pacmar. En jaune, les amorces à PCR utilisées pour l'amplification**

GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA
 GCGCAACGCAATTAATGT **GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTT**
TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGG
 AAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAA
 GCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGA
 ATTCACTAGTGATT **TACGAGGGGTGATCAGAAAGTAATGACAGTCGGACTGGTACCAGAGAGACTA**
 TGAGCGCTGGGAGGGAGGGGAGCGAGGAGCATCAAGTCTTGCCTGTTGTGACACGTTTGAACCTTGCCGC
 CGCTTGGGCTGGGTTACATATACTCGTTGCGCTGTGCGATTGCGTCAGTGTTAGTTTCACGCTCTTACC
 GGAAACATGGATTTCTCGAAGGAAGGTTGCAGGTTCTACACGTTCACTAGGTGGAAACTCGGGAATAAA
 GCAACGGAGATCAGAGGGGAATTATTGCAAGTTTTCCCGAGTCTACTCCATCACTGGAAACTGTTTCC
 CGCTGGATTTCGAGCTTTCGCGGCCGGAAAACTCAGCTTGAAGATGATCATCGCTCTGGACGCCCTCGG
 ACATCCGTGACCGAAGCAACAACGGTCCGTGCGCGGGCCATCATTGACAAAGATCCAAGTGTACTCTA
 CGATTCTTATCCTTGGAGCTTGGTGTGAGTTATGGGAGTGCACATGACATCGTCCATGAACAGTTAGGG
 CTGAGGAAGAAGTGTGCTCGATGGATACCCCATTTGCTAACGGAAGAAGAGCGAACGGGTGCGG
 ATTTGTGCTCTCTGGCTGGCTGAATTTCGAGCCAAATGGTCCCAAACGGTTCTCAGATGTTGCTACCGGA
 GATGAGTGTGGATTTCTTTCTTACCACCAGAGACAAGCAGTCCAACATGGTGTGGTTGAGTGATGAA
 GAGCCTCGACCTCAGATTTTGAAGGAAGGATTTTCGAGCAGGAAGCGCCTTTTACCATCTTCTTCAAT
 TCTCAAGGACCAATGTGTGTGGATGTGATGCCTCAACAGTCTACTATCACAGCCCAGTACTACACTGAC
 CAGGTCCTTCTCAAGTCCTGGAACATCAGGCCAAGTCCGCACCAACCCGCCCGGATCGCGCCTTTTG
 CTGCACCACGACAATGCTTCACCCACAAAGCTCGCCTCACTGTGCAGTTCCTGGAGCAGCAGGGGATC
 AACTTCTCCCCACCCACCCTACTCTCCTGACCTTGCTCCCTGTGATTTTTGGTTGTTTCCAAAGATC
 AAGGGTGCAATCGCAGGGAAGCAGTTTCATCGCATCCAAGACCTGGCGCGAACAGTCAATTCAGAGCTA
 CGAGGTATACCGGCTTCTGAGTACCGTGACTGCTTCATGAAGTGGCGAAAGAGGATGGAACGCTGCATA
 GAGGCAGGAGGGGAGTACTTTGAAGGAATGTAGGCCGCTGTTTGGATGTAGCTCTGTACTACCAAATA
 TATGGTCTCACTGTCATTACTTTCTGATCACCCCTCGTA **AATCGAATTC**CCGCGGCCGCGCATGC
 GGCCGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTC
 ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTA **CCCAACTTAA**
TCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCC

FIGURE 4.25 – **Séquence utilisée pour l'amplification de double brin d'ADN pour l'étude de l'interaction MOS1 / ADNdb du chapitre 4**

CCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCA
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGAT
AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACG
TCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCA
AGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATT
TAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAG
CGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCG
CTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGG
GCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGC
GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAG
CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCGTTTACCAGGTGTACAAGTAGGG
AATGTCGGTTCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGGGAAACAGACCATGAAATCTAACAAT
GCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCC
GGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCG
TGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCC
GACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCGTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGC
GATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCA
CCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGG
GCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGC
CGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGTCATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACG
GCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCG
ATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGT
CGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCT
GGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCG
GTATTCGGAATCTTGACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAACGTTT
CGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGG
CGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATC
GGGATGCCCGCGTTGACAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCT
TCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCAAGG
CGATTTATGCCGCCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTA
TACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAAT
GGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGAAACGACATT
TCATACTTGTACACCTGATAATTTGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAG
TGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT
AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
CCGCTTTCCAGTCGGGAAAC
CTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGG

Production et purification de la protéine HsRad51

La production en cellule eucaryote et la purification de la protéine HsRad51 a été réalisé au sein de l'U3B à l'Université de Nantes. La protéine est produite en cellule eucaryote, celle-ci possède dans un premier temps un tag histidine en position N-terminale. Le tag histidine permet de purifier la protéine sur une colonne de nickel des autres protéines provenant des cellules. Après avoir récupéré la protéine, celle-ci est séparé de son tag histidine pour ensuite être purifiée par HPLC (colonne échangeuse d'anions). Le protocole de production et de purification a été réalisé par le Dr Axelle Renodon-Cornière au sein de l'U3B et est présenté dans l'annexe suivante.

Annexe 2 - Protocole de production et de purification de la protéine HsRad51

Abréviations utilisées :

Amp : Ampicilline
APS : Ammonium Persulfate
Chl : Chloramphénicol
DO : Densité Optique
DMSO : Dimethylsulfoxyde
DTT : Dithiotreitol
HP : Heat shock Protein
HsRad51 : protéine Rad51 humaine
IPTG : Isopropyl- β -D-Thioglucopyranoside
LB : Luria Bertani
NiNTA : Nickel Nitrilotriacetic
Ovn : overnight = sur la nuit
RT : Room Temperature = température ambiante
SN : surnageant
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate = lauryl sulfate
TEMED : Tetramethylethylenediamine

Préparations

Réaliser impérativement les préparations ci-dessous avant de commencer le protocole de purification de HSRad51.

Pour les parties suivantes, il faut :

1-Transformation des cellules par choc thermique

Des **cellules compétentes** BL21.

boîtes de **LB-Amp-Chl.**

Le vecteur d'expression **pET15b-HsRad51.**

2-Culture bactérienne

2L de **LB** dans **2 erlenmeyers** de **5L.**

IPTG 1M, Amp, Chl.

3-Sonication des cellules transformées

50 ml tampon **A.**

4-Chromatographie sur colonne NiNTA

50 ml tampon **A.**

50 ml tampon **B.**

50 ml tampon **C.**

1L tampon **D.**

5-Purification sur colonne échangeuse d'anions (MonoQ)

100 ml tampon **D.**

100 ml tampon **E.**

1L tampon **F.**

1-Transformation des cellules par choc

NB : Travailler stérilement

Préliminaires :

Préparer les 2 erlens (5L) de 1L de LB à autoclaver 20 min à 120°C.

Décongeler sur glace 100 µl de **cellules compétentes BL21 (x2)**.

Décongeler le vecteur **pET15b-HsRad51**.

Régler le bain marie à **42°C**.

Préchauffer le **milieu liquide LB** dans le bain-marie à 42°C.

Mettre **2 boîtes LB-Amp-Chl** à RT.

Placer à **30°C** les 2 erlens (5L) de 1L de LB.

Protocole (durée ≈ 2h30-2h45)

1- Mélanger dans un tube eppendorf de 1,5 ml (**x2**) :

100 µl de **cellules compétentes BL21**
+ **1-50 ng** du vecteur **pET15b-HsRad51**

Homogénéiser le mélange en tapotant avec le doigt (Attention : Ne pas pipeter) et incubé pendant **30'** sur **glace**.

2- **Choc thermique** dans le bain marie à **42°C** pendant **45 sec**.

3- Placer les tubes sur **glace** pendant **10 min**.

4- Ajouter **900 µl** de milieu **LB** préchauffé et mélanger 2 fois en tapotant.

5- Mettre les tubes sous **agitation** à **37°C** pendant **1H**.

6- Centrifuger à **13000 rpm** pendant **5'** à **RT** puis **Jeter les SN** (retourner les tubes).

7- **Remettre en suspension les culots** de cellules dans le reste de SN (≈50 µl).

8- **Ensemencer** les 2 boîtes de pétri à l'aide d'un étaleur.

9- Placer les boîtes de pétri à l'étuve à **37°C ovn** (couvercle en bas).

2-Culture bactérienne

Préliminaires :

Peser les pots à centrifugation.

Protocole (durée \approx 5h30-7h pour avoir $DO_{600nm} = 0.6$ (si au départ nombreuses colonies)
+ **6 à 20h de culture** + 2h-2h30 de centrifugation des 2L de culture)

1- **Ensemencer 1L** de LB, contenant **1ml d' Amp** à 100 mg/ml et de **Chl** à 30 mg/ml, avec la **totalité du tapis bactérien** de chacune des boîtes.

2- Cultiver à **30°C** sous **agitation plateau** jusqu'à **$DO_{600nm} = 0,6$** .

4- A **$DO_{600nm} = 0,6$** :

- Prélever un **échantillon de 1ml** (*Centrifuger 5' à 13000 rpm à RT, Aspirer tout le SN, Stocker à -20°C*)
- Induire l'expression en ajoutant **1ml d'IPTG 1M**

5- Culture pendant **6 à 20 H** à **30°C (~18H)**.

Après l'induction :

- Prélever un **échantillon de 1ml** (*Centrifuger 5' à 13000 rpm à RT, Aspirer tout le SN, Stocker à -20°C*).
- Centrifuger les cultures dans des pots de 250ml pendant **30 min**

à **4100 rpm** et à **4°C**.

6- Peser les culots :

Masse 1 = g

Masse 2 = g

Stocker les culots cellulaires au congélateur (-20°C).

3-Sonication des cellules transformées

Préliminaire :

Laisser refroidir la centrifugeuse.

Rajouter le b-mercaptoethanol dans le tampon A (17.75µl dans 50mL)

Protocole (durée ≈ 3h-4h) :

1- Reprendre les culots de cellules dans **20 ml** de **tampon A**.

2- Sonication (**3 fois 1'45 à 70%**).

	Sonication 1	Sonication 2	Sonication 3
Température de départ (°C) NB : ≈2°C			
Puissance (W) ≈ 21 (65%)			
Temps NB : 1'45			
Température finale (°C) NB : ≈16°C			

3- Centrifuger pendant **27 min** à **16000 speed, 22600 RCF (15000rpm)** et à **4°C**.

4- Pendant ce temps, préparer **1 ml (2 ml sol)** de résine de NiNTA en la lavant avec 2 fois 5ml de Tampon A.

5- Mélanger la **résine NiNTA** et le **SN de la sonication**.

6- Incuber **1H** à **4°C** sous **agitation** avec le plateau balance.

4-Chromatographie sur colonne NiNTA

Préliminaire :

Penser à purger le biologic LP. Passer de l'eau dans tous les tuyaux, le piston et l'UV.
Puis purger avec les tampons correspondants (en commençant par le tampon C (ty B), B (Ty A) puis A (tyD). Finir en passant le tampon D dans le piston et UV (1ml/min = start).
Allumer l'HPLC.

Protocole (durée \approx 4h-4h45) :

- 1- Couler la colonne avec le mélange **résine + SN de sonication** et **récupérer** ce qui **n'est pas retenu par la colonne NiNTA** pour l'analyser sur gel d'électrophorèse. Laver avec 3-4 fois 5ml de tampon A puis laisser suffisamment de tampon dans la colonne pour mettre le piston.
- 2- Réaliser le protocole de chromatographie suivant :

	Temps (min)	Tampon
Lavage	20	100% B (tuyau A)
Gradient	45	100% B \rightarrow 100% C (tuyau B)
Lavage	45	100% C
Lavage	30	100% A (tuyau D)

débit = **0,33 ml/min**

Fraction = **3 min**

- 3- A l'aide d'une pipette faire un **pool** des fractions contenant **HsRad51** (voir pics du chromatogramme). Penser à récupérer 30 μ l de chaque fraction nécessaire pour le gel SDS. Y Ajouter 7 μ l de Bleu.
- 4- Réaliser un dosage protéique du pool par la méthode de **Bradford**. Prendre 1 et 2.5 μ l de BSA 2mg/ml et 5 et 10 μ l du pool de protéine dans 1mL de bradford.
- 5- Ajouter de la **Thrombine (1,5U/1 mg HsRad51)** stockée à 1U/ μ l à -80°C .
- 6- Réaliser une **dialyse** contre **1L de tampon D** sous agitation magnétique à **4°C ovn (16-20 H)**.

5-Purification sur colonne échangeuse d'anions

Préliminaire :

Lancer un programme blanc de l'HPLC pour nettoyer la colonne.
Nettoyer le Biologic LP à l'eau puis à l'éthanol.

Protocole (durée \approx 6h30-7h) :

- 1- Vers 12-13h, reprendre l'échantillon après dialyse et centrifuger **10'** à **4100 rpm**.
Transvaser le SN dans un nouveau tube de 50mL.
- 2- Chromatographie sur colonne MonoQ (détection UV à **280nm** et ~~fluor~~ $\lambda_{\text{excitation}} = 295\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 335\text{nm}$)
Passer l'échantillon obtenu après la dialyse et la centrifugation.

Le protocole de chromatographie est le suivant :

	Temps (min)	Tampon
Lavage	40	100% D (tuyau A)
Gradient	20	100% D \rightarrow 100% E (ty B)
Lavage	15	100% E
Lavage	10	100% D

débit = **0,5 ml/min**

Fraction = **1 min**

- 3- Doser au **Bradford** (*2 • l des fractions dans 300 • l de bradford*). Repérer les fractions les plus concentrées (aux environs de 60min).
- 4- **Dialyse** contre **1L de tampon F** (*2-3 H en 2-3 fois*).

Préparation des solutions mères

Produits	Volume préparé	Masse à prélever	Masse molaire (g/mol)
Tris HCL pH 8 1M	1L	121.14g/157.6	121.14/157.6
NaCl 5M	1L	292,2g	58,44
Imidazole 5M	250ml	85,1g	68,08
β mercaptoéthanol 14M			78,13
Glycérol (Fluka)			
KCL 3M	1L	223.2g	74,4
EDTA 0,5M pH 8	250ml	36.5g	292,2 (pas toujours)
DTT 1M	20ml	3,08g	154.2

Préparation des tampons

	Tampon A		Tampon B		Tampon C	
	Concentration	Volume Solution Mère	Concentration	Volume Solution Mère	Concentration	Volume Solution Mère
Tris HCl pH 8 1M	50 mM	10 ml	50 mM	10 ml	50 mM	10 ml
NaCl 5M	500 mM	20ml	500 mM	20 ml	500 mM	20 ml
Imidazole 5M	5 mM	0.2 ml	60 mM	2.4 ml	500 mM	20 ml
Glycérol	10 %	20 ml	10 %	20 ml	10 %	20 ml
	Qsp avec 200ml d'eau distillée		Qsp avec 200ml d'eau distillée		Qsp avec 200ml d'eau distillée	

β mercaptoéthanol 14M. Ajouter juste avant utilisation 17.75μl dans 50mL de tampon (concentration final = 5mM).

Rq : Tous les tampons sont ajustés à pH 8 puis filtrés/dégazés

	Tampon D		Tampon E	
	Concentration	Volume Solution Mère	Concentration	Volume Solution Mère
Tris HCl pH 8 1M	20 mM	10 ml	20 mM	10 ml
KCl 3M	200 mM	33 ml	600 mM	100 ml
EDTA 0.5M	0.25 mM	250µl	0.25mM	250µl
DTT/Glycérol				
	Qsp avec 500ml d'eau distillée		Qsp avec 500ml d'eau distillée	

β mercaptoéthanol 14M. Ajouter juste avant utilisation 14.28µl dans 100mL de tampon (concentration final = 2mM).

	Tampon D (Dialyse)		Tampon F	
	Concentration	Volume Solution Mère	Concentration	Volume Solution Mère
Tris HCl pH 8 1M	20 mM	20 ml	20 mM	20 ml
KCl 3M	200 mM	66 ml	200 mM	66 ml
EDTA 0.5M	0.25 mM	500µl	0.25 mM	500 µl
DTT 1M			5 mM	5 ml
Glycérol	10 %	100 ml	0 ou 20 %	0 ou 200 ml
β mercaptoéthanol 14M juste avant dialyse	2 mM	142.8 µl		
	Qsp avec 1L d'eau distillée		Qsp avec 1L d'eau distillée	

Rq : Tous les tampons sont ajustés à pH 8 puis filtrés/dégazés

Annexe 3 - Equations cinétiques employées dans les chapitres 3 et 4

Une réaction chimique est régit tout d'abord par sa thermodynamique puis par sa cinétique. En effet, la thermodynamique nous permet de dire si une réaction est possible ou non. Cependant, même si la thermodynamique nous indique que la réaction a bien lieu, elle ne nous dit pas à qu'elle vitesse elle se réalise. Une réaction peut très bien être envisageable thermodynamiquement, mais être beaucoup trop lente pour que l'on puisse la voir se produire. En ce sens, dans tout organisme vivant que ce soit procaryote ou eucaryote, les enzymes agissent en tant que catalyseurs biologiques. Leur premier rôle est donc de modifier la vitesse de la réaction acceptée par la thermodynamique mais trop lente pour être envisagée seule. Puisque les enzymes agissent sur les vitesses de réaction il est nécessaire d'en étudier leur mécanismes cinétiques.

Nous avons ainsi à travers les différents chapitres, employé différents mécanismes permettant de décrire les cinétiques de réactions des protéines étudiées. Nous allons à présent détailler certains points de la mise en équations de ces différents mécanismes cinétiques.

Réactions successives - Chapitre 3 : HsRad51

Dans le chapitre 3, lorsque nous avons développé le modèle caractérisant la cinétique de la formation du filament de HsRad51, nous avons employé le terme de réaction successive (ou consécutive). On emploie ce terme pour parler de réaction où les produits de la première réaction sont les réactifs de la se-

conde. Et les produits de la seconde réaction sont à leur tour les réactifs de la troisième réaction, sans être jamais régénérés, et cela autant de fois qu'il y a de réactions. Ainsi, à chaque étape on se retrouve en présence d'un intermédiaire réactionnel. Par intermédiaire réactionnel, nous parlons de molécules qui peuvent de nouveau réagir, mais cela n'implique pas comme dans les réactions en chaînes une concentration en intermédiaires constante au cours de la réaction.

L'exemple le plus simple et également celui que nous avons employé, en supposant dans notre cas que les constantes d'associations étaient les mêmes à n'importe quel niveau de la réaction, est constitué de deux réactions élémentaires mono-moléculaires successives :



Dont on peut facilement écrire les équations cinétiques :

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad (4.29)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad (4.30)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (4.31)$$

Où l'équation 4.30 correspond à la vitesse de disparition de composé A pour donner B. Ensuite, B est produit par la première réaction mais également consommé par la deuxième, d'où l'équation cinétique 4.31. Et enfin, le produit C est fonction uniquement de la cinétique de disparition du composé B *via* l'équation 4.31.

A partir de ces équations, nous pouvons obtenir la forme intégrée correspondant à chaque variation de concentration, en considérant en premier lieu que :

$$[A]_0; [B]_0 = [C]_0 = 0 \quad (4.32)$$

$$\forall t, [A] + [B] + [C] = [A]_0 \quad (4.33)$$

On en déduit pour l'équation 4.30 sa forme intégrale :

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (4.34)$$

Equation que l'on peut remplacer dans l'équation 4.31 :

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} - k_2 [B] \quad (4.35)$$

$$\frac{d[B]}{dt} + k_2 [B] = k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (4.36)$$

il s'agit d'une équation différentielle du premier ordre, linéaire, avec un second membre variable. Ce type d'équation est intégrable par la méthode de Lagrange ou de "variation des constantes".

Premièrement, on détermine la solution de l'équation sans le second membre et dans le cas où les constantes cinétiques sont différentes ($k_1 \neq k_2$). Ainsi, après avoir retiré le second membre et avoir séparé les variables on obtient :

$$\frac{d[B]}{[B]} = -k_2 dt \quad (4.37)$$

Qui s'intègre sous la forme :

$$\ln[B] = -k_2 t + K_1 \quad (4.38)$$

$$[B] = e^{-k_2 t + K_1} = K'_1 e^{-k_2 t} \quad (4.39)$$

Où, K'_1 est une constante d'intégration, dont la méthode de Lagrange consiste à la considérer comme une fonction inconnue et qui doit être compatible avec l'équation 4.36.

Pour déterminer la fonction K'_1 , on commence par dériver l'équation 4.39 :

$$\frac{d[B]}{dt} = \frac{dK'_1}{dt} e^{-k_2 t} - K'_1 k_2 e^{-k_2 t} \quad (4.40)$$

Puis on injecte les équations 4.39 et 4.40 dans l'équation complète 4.36 :

$$\frac{dK'_1}{dt} e^{-k_2 t} - K'_1 k_2 e^{-k_2 t} + k_2 K'_1 e^{-k_2 t} = k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (4.41)$$

Qui peut se simplifier en séparant les différentes variables par :

$$dK'_1 = k_1[A]_0 e^{(k_2-k_1)t} dt \quad (4.42)$$

Et du fait que l'on considère dans notre cas que $k_1 \neq k_2$, alors :

$$K'_1 = \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2-k_1)t} + K_2 \quad (4.43)$$

Où K_2 est une constante d'intégration.

Puis, en revenant à l'équation 4.39, on obtient :

$$[B] = \left(\frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2-k_1)t} + K_2 \right) e^{-k_2 t} \quad (4.44)$$

Pour déterminer la constante d'intégration K_2 , il faut par exemple considérer $B = 0$ à $t = 0$, et on obtient :

$$K_2 = -\frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} \quad (4.45)$$

Ce qui nous donne au final l'équation permettant de décrire la variation de la concentration en B au cours du temps :

$$[B] = \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (4.46)$$

Ainsi, à partir de l'équation 4.46 en l'injectant dans l'équation 4.31 et après intégration on obtient la variation de la concentration en C :

$$[C] = \frac{[A]_0}{k_2 - k_1} (k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t} + 1) \quad (4.47)$$

Réaction bimoléculaire réversible - Chapitre 4 : MOS1

Dans le chapitre 4, nous avons employé un mécanisme avec un équilibre bi-moléculaire donnant un produit unique que l'on peut écrire de la façon suivante :



Où k_{on} et k_{off} sont respectivement les constantes cinétiques de vitesses d'activation et de désactivation. Le rapport des deux constantes nous donne la constante de dissociation K_d ou la constante d'association $K_a = \frac{1}{K_d}$. Dans ce cas, on peut écrire l'équation de vitesse de formation du produit (complexe (MOS1)₂ / ITR) :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{on}[A][B] - k_{off}[P] \quad (4.49)$$

On considère alors que $[P]_0 = 0$ à $t = 0$, et qu'à tout moment de la réaction (dans le cas du chapitre 4) que la variation de la concentration du produit B est négligeable et donc qu'à tout instant on considère que $[B] = [B]_0$, ce qui nous permet d'écrire l'équation de vitesse suivante :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{on}([A]_0 - [P])[B]_0 - k_{off}[P] \quad (4.50)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{on}[A]_0[B]_0 - [P](k_{on}[B]_0 + k_{off}) \quad (4.51)$$

Après séparation des variables :

$$\frac{d[P]}{k_{on}[A]_0[B]_0 - [P](k_{on}[B]_0 + k_{off})} = dt \quad (4.52)$$

Cela nous permet d'obtenir après intégration :

$$\frac{\ln(k_{on}[A]_0[B]_0 - [P](k_{on}[B]_0 + k_{off}))}{-(k_{on}[B]_0 + k_{off})} = t + \alpha \quad (4.53)$$

Si nous posons que $[P] = 0$ à $t = 0$, nous obtenons alors $\alpha = -\frac{\ln(k_{on}[A]_0[B]_0)}{k_{on}[B]_0 + k_{off}}$, et par conséquent l'équation suivante :

$$\ln \frac{k_{on}[A]_0[B]_0 - [P](k_{on}[B]_0 + k_{off})}{k_{on}[A]_0[B]_0} = -(k_{on}[B]_0 + k_{off})t \quad (4.54)$$

En prenant l'exponentielle des deux côtés, nous obtenons :

$$\frac{k_{on}[A]_0[B]_0 - [P](k_{on}[B]_0 + k_{off})}{k_{on}[A]_0[B]_0} = e^{-(k_{on}[B]_0 + k_{off})t} \quad (4.55)$$

Qui peut être remis sous la forme :

$$[P] = \frac{k_{on}[A]_0[B]_0(1 - e^{-(k_{on}[B]_0 + k_{off})t})}{k_{on}[B]_0 + k_{off}} = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_{on}[B]_0 + k_{off})t}) \quad (4.56)$$

où $[P]_{\infty} = k_{on}[A]_0[B]_0/(k_{on}[B]_0 + k_{off})$ est la valeur de $[P]$ après un temps infini, c'est-à-dire à l'équilibre, et dans le cas du chapitre 4 Δm_{∞} . Nous retrouvons ainsi le temps de relaxation $\tau^{-1} = k_{on}[B]_0 + k_{off}$ et donc :

$$[P] = [P]_{\infty}(1 - e^{-t/\tau}) \quad (4.57)$$

$$\text{ou } \Delta m_t = \Delta m_{\infty}(1 - e^{-t/\tau}) \quad (4.58)$$

Bibliographie

- [1] Jr. L. C. Clark and C. Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, 102 :29–45, 1962.
- [2] Audrey Sassolas, Loïc J Blum, and Béatrice D Leca-Bouvier. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*, 30 :489–511, 2012.
- [3] Bernd Becker and Matthew A Cooper. A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature. *J Mol Recognit*, 24 :754–787, 2011.
- [4] Paul D’Orazio. Biosensors in clinical chemistry — 2011 update. *Clinica Chimica Acta*, 412 :1749–1761, 2011.
- [5] Paul D’Orazio. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334 :41–69, 2003.
- [6] Joseph Wang. Glucose biosensors : 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, 13 :983–988, 2001.
- [7] Md. Mahbubur Rahman, A. J. Saleh Ahammad, Joon-Hyung Jin, Sang Jung Ahn, and Jae-Joon Lee. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 10 :4855–4886, 2010.
- [8] JW Mo and W. Smart. Lactate biosensors for continuous monitoring. *Front Biosci*, 9 :3384–3391, 2004.
- [9] Bhavik Anil Patel, Michelle Rogers, Talia Wieder, Danny O’Hare, and Martyn G Boutelle. Atp microelectrode biosensor for stable long-term in vitro monitoring from gastrointestinal tissue. *Biosens Bioelectron*, 26 :2890–2896, 2011.
- [10] M J Moorcroft, J Davis, and R G Compton. Detection and determination of nitrate and nitrite : a review. *Talanta*, 54 :785–803, 2001.

- [11] Gang Wang, Jing-Juan Xu, Li-Hua Ye, Jun-Jie Zhu, and Hong-Yuan Chen. Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. *Bioelectrochemistry*, 57 :33–38, 2002.
- [12] Zhonghan Sheng, Jianhua Han, Jianping Zhang, Hong Zhao, and Long Jiang. Method for detection of Hg^{2+} based on the specific thymine- Hg^{2+} -thymine interaction in the dna hybridization on the surface of quartz crystal microbalance. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 87 :289–292, 2011.
- [13] Yongxin Li, Qiufang Lu, Aibin Shi, Yuanli Chen, Shengnan Wu, and Lun Wang. Electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid using the synergistic effect of gold nanoflowers and l-cysteamine monolayer at the surface of a gold electrode. *Anal Sci*, 27 :921–7, 2011.
- [14] W M Freeman, D J Robertson, and K E Vrana. Fundamentals of dna hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*, 29 :1042–6, 1048–55, 2000.
- [15] Paul J Conroy, Stephen Hearty, Paul Leonard, and Richard J O’Kennedy. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Semin Cell Dev Biol*, 20 :10–26, 2009.
- [16] Bansi D Malhotra and Asha Chaubey. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B*, 91 :117–127, 2003.
- [17] Anton B Iliuk, Lianghai Hu, and W Andy Tao. Aptamer in bioanalytical applications. *Anal Chem*, 83 :4440–4452, 2011.
- [18] Juewen Liu, Zehui Cao, and Yi Lu. Functional nucleic acid sensors. *Chem Rev*, 109 :1948–1998, 2009.
- [19] Wenjuan Li, Ruo Yuan, Yaqin Chai, Lu Zhou, Shihong Chen, and Na Li. Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for the preparation of hydrogen peroxide biosensor. *J Biochem Biophys Methods*, 70 :830–837, 2008.
- [20] Manzar Sohail and Samule B. Andeloju. Electroimmobilization of nitrate reductase and nicotinamide adenine dinucleotide into polypyrrole films for potentiometric detection of nitrate. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 133 :333–339, 2008.
- [21] Dan Shan, Yuanyuan He, Shanxia Wang, Huaiguo Xue, and Hao Zheng. A porous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) film-based glucose biosensor

- constructed by electrochemical entrapment. *Anal Biochem*, 356 :215–221, 2006.
- [22] Songqin Liu and Yueming Sun. Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and atp detections. *Biosens Bioelectron*, 22 :905–911, 2007.
- [23] Christophe A Marquette, Agnès Degiuli, and Loïc J Blum. Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosens Bioelectron*, 19 :433–439, 2003.
- [24] Yu-Chen Tsai, Siao-Yun Chen, and Chen-An Lee. Amperometric cholesterol biosensors based on carbon nanotube–chitosan–platinum–cholesterol oxidase nanobiocomposite. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 135 :96–101, 2008.
- [25] Hsiao-Chung Tsai, Ruey-An Doong, Huai-Chih Chiang, and Kun-Tien Chen. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal Chim Acta*, 481 :75–84, 2003.
- [26] Murali Sastry. Entrapment of proteins and dna in thermally evaporated lipid films. *Trends Biotechnol*, 20 :185–188, 2002.
- [27] Béatrice Leca, Renée M. Morélis, and Pierre R. Coulet. Direct biosensor coating with a photopolymerised microlayer through a controllable step-procedure. *Microchimica Acta*, 121 :147–154, 1995.
- [28] Haibin Shi, Yu Yang, Jiadong Huang, Zixia Zhao, Xinhua Xu, Jun-Ichi Anzai, Tetsuo Osa, and Qiang Chen. Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline oxidase on the prussian blue-modified platinum electrode. *Talanta*, 70 :852–858, 2006.
- [29] Mònica Mir, Antoni Homs, and Josep Samitier. Integrated electrochemical dna biosensors for lab-on-a-chip devices. *Electrophoresis*, 30 :3386–3397, 2009.
- [30] A.L. Berezhetskyya, O.F. Sosovska, C. Durrieub, J.-M. Chovelonc, S.V. Dzyadevycha, and C. Tran-Minh. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. *IRBM*, 29 :136–140, 2008.
- [31] Zhiqiang Zhang, Siqing Xia, Didier Leonard, Nicole Jaffrezic-Renault, Jiao Zhang, François Bessueille, Yves Goepfert, Xuejiang Wang, Ling

- Chen, Zhiliang Zhu, Jianfu Zhao, M Gabriela Almeida, and Célia M Silveira. A novel nitrite biosensor based on conductometric electrode modified with cytochrome c nitrite reductase composite membrane. *Biosens Bioelectron*, 24 :1574–1579, 2009.
- [32] E V Gogol, G A Evtugyn, J L Marty, H C Budnikov, and V G Winter. Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors. *Talanta*, 53 :379–389, 2000.
- [33] Arnaldo C. Pereira^a, Marina R. Aguiar^b, Alexandre Kisner^c, Denise V. Macedo^a, and Lauro T. Kubota. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and meldola blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 124 :269–276, 2007.
- [34] Lu Shin Wong, Farid Khan, and Jason Micklefield. Selective covalent protein immobilization : strategies and applications. *Chem Rev*, 109 :4025–4053, 2009.
- [35] Niina J Ronkainen, H Brian Halsall, and William R Heineman. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*, 39 :1747–1763, 2010.
- [36] S Cosnier. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. a review. *Biosens Bioelectron*, 14 :443–456, 1999.
- [37] Serge Cosnier and Arielle Lepellec. Poly(pyrrole-biotin) : a new polymer for biomolecule grafting on electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 44 :1833–1836, 1999.
- [38] Kenichi Niikura, Hisao Matsuno, and Yoshio Okahata. Direct monitoring of dna polymerase reactions on a quartz-crystal microbalance. *J Am Chem Soc*, 120 :8537–8538, 1998.
- [39] Catherine M. Halliwell, Evelyne Simon, Chee-Seng Toh, Philip N. Bartlett, and Anthony E.G. Cass. Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly- (vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Anal Chim Acta*, 453 :191–200, 2002.
- [40] Naoufel Haddour, Serge Cosnier, and Chantal Gondran. Electrogeneration of a poly(pyrrole)-nta chelator film for a reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc*, 127 :5752–5753, 2005.

- [41] Claudia Ley, Dirk Holtmann, Klaus-Michael Mangold, and Jens Schräder. Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 88 :539–551, 2011.
- [42] Christopher Batchelor-McAuley, Edmund J F Dickinson, Neil V Rees, Kathryn E Toghill, and Richard G Compton. New electrochemical methods. *Anal Chem*, 84 :669–684, 2012.
- [43] Agnès Anne and Christophe Demaille. Electron transport by molecular motion of redox-dna strands : unexpectedly slow rotational dynamics of 20-mer ds-dna chains end-grafted onto surfaces via c6 linkers. *J Am Chem Soc*, 130 :9812–9823, 2008.
- [44] Kang Wang, Cédric Goyer, Agnès Anne, and Christophe Demaille. Exploring the motional dynamics of end-grafted dna oligonucleotides by in situ electrochemical atomic force microscopy. *J Phys Chem B*, 111 :6051–6058, 2007.
- [45] Agnès Anne and Christophe Demaille. Dynamics of electron transport by elastic bending of short dna duplexes. experimental study and quantitative modeling of the cyclic voltammetric behavior of 3'-ferrocenyl dna end-grafted on gold. *J Am Chem Soc*, 128 :542–557, 2006.
- [46] Ying Liu, Nazgul Tuleouva, Erlan Ramanculov, and Alexander Revzin. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection. *Anal Chem*, 82 :8131–8136, 2010.
- [47] F Lisdat and D Schäfer. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem*, 391 :1555–1567, 2008.
- [48] Jin-Young Park and Su-Moon Park. Dna hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool. *Sensors*, 9 :9513–9532, 2009.
- [49] Jin-Young Park and Su-Moon Park. Dna hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool. *Sensors (Basel)*, 9(12) :9513–9532, 2009.
- [50] Charles Cougnon, Christelle Gautier, Jean-François Pilard, Nathalie Casse, and Benoît Chénais. Redox and ion-exchange properties in surface-tethered dna-conducting polymers. *Biosens Bioelectron*, 23 :1171–1174, 2008.

- [51] Christelle Gautier, Charles Cougnon, Jean-François Pilard, Nathalie Casse, and Benoît Chénais. A poly(cyclopentadithiophene) matrix suitable for electrochemically controlled dna delivery. *Anal Chem*, 79 :7920–7923, 2007.
- [52] Hui Peng, Christian Soeller, Nicholas A Vigar, Vittorio Caprio, and Jadranka Travas-Sejdic. Label-free detection of dna hybridization based on a novel functionalized conducting polymer. *Biosens Bioelectron*, 22 :1868–1873, 2007.
- [53] Christelle Gautier, Charles Esnault, Charles Cougnon, Jean-François Pilard, Nathalie Casse, and Benoît Chénais. Hybridization-induced interfacial changes detected by non-faradaic impedimetric measurements compared to faradaic approach. *J. of Electroanalytical Chemistry*, 610 :227–233, 2007.
- [54] Martin M. F. Choi. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta*, 148 :107–132, 2004.
- [55] Wen Zhang, Haidong Chang, and Garry A. Rechnitz. Dual-enzyme fiber optic biosensor for pyruvate. *Anal Chim Acta*, 350 :59–65, 1997.
- [56] Bipasha Dey, Sameer Thukral, Shruti Krishnan, Mainak Chakrobarty, Sahil Gupta, Chanchal Manghani, and Vibha Rani. Dna-protein interactions : methods for detection and analysis. *Mol Cell Biochem*, 365 :279–299, 2012.
- [57] Thompson M. Freeman and W. Rudolf Seitz. Chemiluminescence fiber optic probe for hydrogen peroxide based on the luminol reaction. *Anal Chem*, 50 :1242–1246, 1978.
- [58] Jerzy Majka and Christian Speck. Analysis of protein-dna interactions using surface plasmon resonance. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 104 :13–36, 2007.
- [59] Meng Jing and Michael T Bowser. Methods for measuring aptamer-protein equilibria : a review. *Anal Chim Acta*, 686 :9–18, 2011.
- [60] Voula Kodoyianni. Label-free analysis of biomolecular interactions using spr imaging. *Biotechniques*, 50 :32–40, 2011.
- [61] Yusuke Arima, Mitsuaki Toda, and Hiroo Iwata. Surface plasmon resonance in monitoring of complement activation on biomaterials. *Adv Drug Deliv Rev*, 63 :988–999, 2011.

- [62] H Matsuno, K Niikura, and Y Okahata. Direct monitoring kinetic studies of dna polymerase reactions on a dna-immobilized quartz-crystal microbalance. *Chemistry*, 7 :3305–3312, 2001.
- [63] Shuntaro Takahashi, Hisao Matsuno, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata. Kinetic analyses of divalent cation-dependent ecorv digestions on a dna-immobilized quartz crystal microbalance. *Analytical Biochemistry*, 361 :210–217, 2007.
- [64] Shuntaro Takahashi, Hisao Matsuno, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata. Direct monitoring of allosteric recognition of type iie restriction endonuclease ecorii. *J Biol Chem*, 283 :15023–15030, 2008.
- [65] Ziv Reich, Ruti Kapon, Reinat Nevo, Yair Pilpel, Sharon Zmora, and Yosef Scolnik. Scanning force microscopy in the applied biological sciences. *Biotechnology advances*, 19 :451–485, 2001.
- [66] Yuri L. Lyubchenko. Preparation of dna and nucleo-protein samples for afm imaging. *Micro*, 42 :196–206, 2011.
- [67] Luda S Shlyakhtenko, Jamie Gilmore, Alex Portillo, Gintautas Tamulaitis, Virginijus Siksnys, and Yuri L Lyubchenko. Direct visualization of the ecorii-dna triple synaptic complex by atomic force microscopy. *Biochemistry*, 46 :11128–11136, 2007.
- [68] Eddy van der Linden, Humberto Sanchez, Eri Kinoshita, Roland Kanaar, and Claire Wyman. Rad50 and nbs1 form a stable complex functional in dna binding and tethering. *Nucleic Acids Res*, 37 :1580–1588, 2009.
- [69] Nina A Filenko, Carol Kolar, John T West, S Abbie Smith, Yousef I Hassan, Gloria E O Borgstahl, Janos Zemleni, and Yuri L Lyubchenko. The role of histone h4 biotinylation in the structure of nucleosomes. *PLoS One*, 6(1) :e16299, 2011.
- [70] Emiliós K Dimitriadis, Christian Weber, Rajbir K Gill, Stephan Diekmann, and Yamini Dalal. Tetrameric organization of vertebrate centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 :20317–20322, 2010.
- [71] Bing Shi Li and M Cynthia Goh. Direct evidence of the role of atpgammas in the binding of single-stranded binding protein (escherichia coli) and reca to single-stranded dna. *Langmuir*, 26 :14755–14758, 2010.

- [72] Michele Menotta, Rita Crinelli, Elisa Carloni, Marzia Bianchi, Elisa Giacomini, Ugo Valbusa, and Mauro Magnani. Label-free quantification of activated nf-kappab in biological samples by atomic force microscopy. *Biosens Bioelectron*, 25 :2490–2496, 2010.
- [73] D N Fronczek, C Quammen, H Wang, C Kisker, R Superfine, R Taylor, D A Erie, and I Tessmer. High accuracy fiona-afm hybrid imaging. *Ultra-microscopy*, 111 :350–355, 2011.
- [74] Ferry Kienberger, Andreas Ebner, Hermann J Gruber, and Peter Hinterdorfer. Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules. *Acc Chem Res*, 39 :29–36, 2006.
- [75] Piyush S Sharma, Agnieszka Pietrzyk-Le, Francis D’Souza, and Wlodzimierz Kutner. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *Anal Bioanal Chem*, 402 :3177–3204, 2012.
- [76] C Vericat, M E Vela, G Benitez, P Carro, and R C Salvarezza. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold : new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev*, 39 :1805–1834, 2010.
- [77] Claudia Haensch, Stephanie Hoeppener, and Ulrich S Schubert. Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions. *Chem Soc Rev*, 39 :2323–2334, 2010.
- [78] Daniel Belanger and Jean Pinson. Electrografting : a powerful method for surface modification. *Chem Soc Rev*, 40 :3995–4048, 2011.
- [79] Hideki Shirakawa, Edwin J. Louis, Alan G. Macdiarmid, Chwan K. Chiang, and Alan J. Heeger. Synthesis of electrically conducting organic polymers : Halogen derivatives of polyacetylene. *J Chem Soc Chem Commun*, 16 :578–580, 1977.
- [80] C. K. Chiang, C. B. Fincher, Y. W. Park, and A. J. Heeger. Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Phys Rev Lett*, 39 :1098–1101, 1977.
- [81] Kevin D O’Neil, Bryan Shaw, and Oleg A Semenikhin. On the origin of mesoscopic inhomogeneity of conducting polymers. *J Phys Chem B*, 111 :9253–9269, 2007.

- [82] J Justin Gooding and Simone Ciampi. The molecular level modification of surfaces : from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. *Chem Soc Rev*, 40 :2704–2718, 2011.
- [83] Stephen B. Roscoe, Ashok K. Kakkar, and Tobin J. Marks. Self-assembled chromophoric nlo-active monolayers. x-ray reflectivity and second-harmonic generation as complementary probes of building block-film microstructure relationships. *Langmuir*, 12 :4218–4223, 1996.
- [84] M. J. Schöning and H. Lüth. Novel concepts for silicon-based biosensors. *Phys. Status Solidi A*, 185, 2001.
- [85] Ruhai Tian, Oliver Seitz, Meng Li, Wenchuang Walter Hu, Yves J Chabal, and Jinming Gao. Infrared characterization of interfacial si-o bond formation on silanized flat sio2/si surfaces. *Langmuir*, 26 :4563–4566, 2010.
- [86] J. D. Le Grange, J. L. Markham, and C. R. Kurkjian. Effects of surface hydration on the deposition of silane monolayers on silica. *Langmuir*, 9 :1749–1753, 1993.
- [87] Colin D. Bain, E. Barry Troughton, Yu-Tai Tao, Joseph Evall, George M. Whitesides, and Ralph G. Nuzzo. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J Am Chem Soc*, 111 :321–335, 1989.
- [88] W. Russell Everett, Timsey L. Welch, Laura Reed, and Ingrid Fritsch-Fades. Potential-dependent stability of self-assembled organothiols on gold electrodes in methylene chloride. *Anal Chem*, 67 :292–298, 1995.
- [89] Nupur Garg, Edwin Carrasquillo-Molina, and T. Randall Lee. Self-assembled monolayers composed of aromatic thiols on gold : Structural characterization and thermal stability in solution. *Langmuir*, 18 :2717–2726, 2002.
- [90] Guohua Yang, Nabil A Amro, Zane B Starkewolfe, and Gang-Yu Liu. Molecular-level approach to inhibit degradations of alkanethiol self-assembled monolayers in aqueous media. *Langmuir*, 20 :3995–4003, 2004.
- [91] Yann R Leroux, Hui Fei, Jean-Marc Noël, Clément Roux, and Philippe Hapiot. Efficient covalent modification of a carbon surface : use of a silyl protecting group to form an active monolayer. *J Am Chem Soc*, 132 :14039–14041, 2010.

- [92] Olivier Buriez, Eric Labbé, Pascal Pigeon, Gérard Jaouen, and Christian Amatore. Electrochemical attachment of a conjugated amino-ferrocifen complex onto carbon and metal surfaces. *J. of Electroanalytical Chemistry*, 619-620 :169–175, 2008.
- [93] Claude P. Andrieux, Felipe Gonzalez, and Jean-Michel Savéant. Derivatization of carbon surfaces by anodic oxidation of arylacetates. electrochemical manipulation of the grafted films. *J Am Chem Soc*, 119 :4292–4300, 1998.
- [94] Hatsuo Maeda, Yuji Yamauchi, Masayuki Hosoe, Tong-Xing Li, Eiichi Yamaguchi, Masaaki Kasamatsu, and Hidenobu Ohmori. Direct covalent modification of glassy carbon surfaces with 1-alkanols by electrochemical oxidation. *Chem. Pharm. bull.*, 42 :1870–1873, 1994.
- [95] Hatsuo Maeda, Takehiro Kitano, Cheng Zhu Huang, Kazunori Katayama, Yuji Yamauchi, and Hidenobu Ohmori. Effective method for the covalent introduction of the 2-(2-carboxymethoxyethoxy)ethoxy group on a glassy carbon electrode by anodization in triethylene glycol. *Anal. Sci.*, 15 :531–536, 1999.
- [96] A. Fidélis, F. Ozanam, and J.-N. Chazalviel. Fully methylated, atomically flat (111) silicon surface. *Surf. Sci.*, 444 :L7–L10, 2000.
- [97] R. M. Eloffson. The polarographic reduction of diazotized aromatic amines. *Can. J. Chem.*, 36 :1207–1210, 1958.
- [98] Stève Baranton and Daniel Bélanger. Electrochemical derivatization of carbon surface by reduction of in situ generated diazonium cations. *J Phys Chem B*, 109 :24401–24410, 2005.
- [99] Charles Cougnon, Frédéric Gohier, Daniel Bélanger, and Janine Mauze-rol. In situ formation of diazonium salts from nitro precursors for scanning electrochemical microscopy patterning of surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(22) :4006–8, 2009.
- [100] Roman Pazo-Llorente, Carlos Bravo-Diaz, and Elisa Gonzalez-Romero. ph effects on ethanolysis of some arenediazonium ions : Evidence for homolytic dediazonation proceeding through formation of transient diazo ethers. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 3221–3226, 2004.
- [101] E. Ahlberg, B. Helgée, and Parker D. Vernon. The reaction of aryl radicals with metallic electrodes. *Acta Chim. Scand. B*, 34b :181–186, 1980.

- [102] Philippe Allongue, Michel Delamar, Bernard Desbat, Olivier Fagebaume, Rachid Hitmi, Jean Pinson, and Jean-Michel Savéant. Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts. *J Am Chem Soc*, 119 :201–207, 1997.
- [103] Mathieu Toupin and Daniel Bélanger. Thermal stability study of aryl modified carbon black by in situ generated diazonium salt. *J Phys Chem C*, 111 :5394–5401, 2007.
- [104] Mathieu D'Amours and Daniel Bélanger. Stability of substituted phenyl groups electrochemically grafted at carbon electrode surface. *J Phys Chem B*, 107 :4811–4817, 2003.
- [105] Jean Pinson and Fetah Podvorica. Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. *Chem Soc Rev*, 34(5) :429–439, 2005.
- [106] Christelle Gautier, Charles Cougnon, Jean-François Pilard, Nathalie Casse, Benoît Chénais, and Marc Laulier. Detection and modelling of dna hybridization by eis measurements. mention of a polythiophene matrix suitable for electrochemically controlled gene delivery. *Biosens Bioelectron*, 22 :2025–2031, 2007.
- [107] Yu-Wei Hu, Tao Yang, Xin-Xing Wang, and Kui Jiao. Highly sensitive indicator-free impedance sensing of dna hybridization based on poly(m-aminobenzenesulfonic acid)/tio2 nanosheet membranes with pulse potentiostatic method preparation. *Chemistry*, 16 :1992–1999, 2010.
- [108] Jinghua Chen, Jing Zhang, Kun Wang, Xinhua Lin, Liying Huang, and Guonan Chen. Electrochemical biosensor for detection of bcr/abl fusion gene using locked nucleic acids on 4-aminobenzenesulfonic acid-modified glassy carbon electrode. *Anal Chem*, 80 :8028–8034, 2008.
- [109] Julien Haccoun, Christine Vautrin-UI, Annie Chaussé, and Alain Adenier. Electrochemical grafting of organic coating onto gold surfaces : Influence of the electrochemical conditions on the grafting of nitrobenzene diazonium salt. *Progress in Organic Coatings*, 63 :18–24, 2008.
- [110] Joël Lyskawa and Daniel Bélanger. Direct modification of a gold electrode with aminophenyl groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations. *Chem. Mater.*, 18 :4755–4763, 2006.

- [111] Jianyun Liu, Long Cheng, Baifeng Liu, and Shaojun Dong. Covalent modification of a glassy carbon surface by 4-aminobenzoic acid and its application in fabrication of a polyoxometalates-consisting monolayer and multilayer films. *Langmuir*, 16 :7471–7476, 2000.
- [112] Xiaofang Li, Yi Wan, and Changqing Sun. Covalent modification of a glassy carbon surface by electrochemical oxidation of r-aminobenzene sulfonic acid in aqueous solution. *J. of Electroanalytical Chemistry*, 569 :79–87, 2004.
- [113] Dan Huang, Zhong-Dang Xiao, Jian-Hua Gu, Ning-Ping Huang, and Cuan-Wei Yuan. Tio₂ thin films formation on industrial glass through self-assembly processing. *Thin Solid Films*, 305 :110–115, 1997.
- [114] Shouguo Wu, Taoling Wang, Zongyong Gao, Haihong Xu, Baineng Zhou, and Chuanqin Wang. Selective detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at physiological ph by using a beta-cyclodextrin modified copolymer of sulfanilic acid and n-acetylaniline. *Biosens Bioelectron*, 23 :1776–1780, 2008.
- [115] Mogens Hinge, Elsa Silva Gonçalves, Steen Uttrup Pedersen, and Kim Daasbjerg. On the electrografting of stainless steel from para-substituted aryl diazonium salts and the thermal stability of the grafted layer. *Surface and Coatings Technology*, 305 :820–827, 2010.
- [116] Mogens Hinge, Marcel Ceccato, Peter Kingshott, Flemming Besenbacher, Steen Uttrup Pedersen, and Kim Daasbjerg. Electrochemical modification of chromium surfaces using 4-nitro- and 4-fluorobenzenediazonium salts. *New J. Chem.*, 33 :2405–2408, 2009.
- [117] Franklin Anariba, Stacy H DuVall, and Richard L McCreery. Mono- and multilayer formation by diazonium reduction on carbon surfaces monitored with atomic force microscopy "scratching". *Anal Chem*, 75 :3837–3844, 2003.
- [118] Xuan Li and Wolf-Dietrich Heyer. Homologous recombination in dna repair and dna damage tolerance. *Cell Res*, 18 :99–113, 2008.
- [119] Andrej Dudás and Miroslav Chovanec. Dna double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res*, 566(2) :131–167, 2004.
- [120] Michael van den Bosch, Ronan T Bree, and Noel F Lowndes. The mrn complex : coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep*, 4 :844–849, 2003.

- [121] T Sugiyama, E M Zaitseva, and S C Kowalczykowski. A single-stranded dna-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *saccharomyces cerevisiae* rad51 protein. *J Biol Chem*, 272 :7940–7945, 1997.
- [122] Tomohiko Sugiyama and Stephen C Kowalczykowski. Rad52 protein associates with replication protein a (rpa)-single-stranded dna to accelerate rad51-mediated displacement of rpa and presynaptic complex formation. *J Biol Chem*, 277 :31663–31672, 2002.
- [123] S Van Komen, G Petukhova, S Sigurdsson, S Stratton, and P Sung. Superhelicity-driven homologous dna pairing by yeast recombination factors rad51 and rad54. *Mol Cell*, 6 :563–572, 2000.
- [124] Kazuhiro Yamada, Mariko Ariyoshi, and Kosuke Morikawa. Three-dimensional structural views of branch migration and resolution in dna homologous recombination. *Curr Opin Struct Biol*, 14 :130–137, 2004.
- [125] M Ariyoshi, T Nishino, H Iwasaki, H Shinagawa, and K Morikawa. Crystal structure of the holliday junction dna in complex with a single ruv tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 :8257–8262, 2000.
- [126] Hideki Aihara, Yutaka Ito, Hitoshi Kurumizaka, Shigeyuki Yokoyama, and Takehiko Shibata. the n-terminal domain of the human rad51 protein binds dna : structure and a dna binding surface as revealed by nmr. *Journal of Molecular Biology*, 290 :495–504, 1999.
- [127] Luca Pellegrini, David S Yu, Thomas Lo, Shubha Anand, MiYoung Lee, Tom L Blundell, and Ashok R Venkitaraman. Insights into dna recombination from the structure of a rad51-brca2 complex. *Nature*, 420 :287–293, 2002.
- [128] Jianhong Chen, Nicolas Villanueva, Mark A Rould, and Scott W Morrical. Insights into the mechanism of rad51 recombinase from the structure and properties of a filament interface mutant. *Nucleic Acids Res*, 38 :4889–4906, 2010.
- [129] Yilun Liu, Alicja Z Stasiak, Jean-Yves Masson, Michael J McIlwraith, Andrzej Stasiak, and Stephen C West. Conformational changes modulate the activity of human rad51 protein. *J Mol Biol*, 337 :817–827, 2004.
- [130] X Yu, S A Jacobs, S C West, T Ogawa, and E H Egelman. Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by rpa and rad51 on dna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :8419–8424, 2001.

- [131] Adam B Conway, Thomas W Lynch, Ying Zhang, Gary S Fortin, Cindy W Fung, Lorraine S Symington, and Phoebe A Rice. Crystal structure of a rad51 filament. *Nat Struct Mol Biol*, 11 :791–796, 2004.
- [132] Kang-Sup Shim, Christoph Schmutte, Kristine Yoder, and Richard Fishel. Defining the salt effect on human rad51 activities. *DNA Repair (Amst)*, 5 :718–730, 2006.
- [133] Hye-Kyung Kim, Katsumi Morimatsu, Bengt Nordén, Malin Ardhammar, and Masayuki Takahashi. Adp stabilizes the human rad51-single stranded dna complex and promotes its dna annealing activity. *Genes Cells*, 7 :1125–1134, 2002.
- [134] Gregory Tomblin, Christopher D Heinen, Kang-Sup Shim, and Richard Fishel. Biochemical characterization of the human rad51 protein. iii. modulation of dna binding by adenosine nucleotides. *J Biol Chem*, 277 :14434–14442, 2002.
- [135] Judith Miné, Ludovic Disseau, Masayuki Takahashi, Giovanni Cappello, Marie Dutreix, and Jean-Louis Viovy. Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single rad51-dna nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Res*, 35 :7171–7187, 2007.
- [136] Thijn van der Heijden, Ralf Seidel, Mauro Modesti, Roland Kanaar, Claire Wyman, and Cees Dekker. Real-time assembly and disassembly of human rad51 filaments on individual dna molecules. *Nucleic Acids Res*, 35 :5646–5657, 2007.
- [137] Jovencio Hilario, Ichiro Amitani, Ronald J Baskin, and Stephen C Kowalczykowski. Direct imaging of human rad51 nucleoprotein dynamics on individual dna molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 :361–368, 2009.
- [138] Wei-Xian Shi and Ronald G Larson. Atomic force microscopic study of aggregation of reca-dna nucleoprotein filaments into left-handed supercoiled bundles. *Nano Lett*, 5 :2476–2481, 2005.
- [139] Julian Nommé, Yoshimasa Takizawa, Susan F Martinez, Axelle Renodon-Cornière, Fabrice Fleury, Pierre Weigel, Ken-ichi Yamamoto, Hitoshi Kurumizaka, and Masayuki Takahashi. Inhibition of filament formation of human rad51 protein by a small peptide derived from the brc-motif of the brca2 protein. *Genes Cells*, 13 :471–481, 2008.

- [140] Benjamin Brillet, Yves Bigot, and Corinne Augé-Gouillou. Assembly of the tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase dna binding domains. *Genetica*, 130 :105–120, 2007.
- [141] J W Jacobson and D L Hartl. Coupled instability of two x-linked genes in drosophila mauritiana : germinal and somatic mutability. *Genetics*, 111 :57–65, 1985.
- [142] Peng Zhou, Feifei Tian, Yanrong Ren, and Zhicai Shang. Systematic classification and analysis of themes in protein-dna recognition. *J Chem Inf Model*, 50 :1476–1488, 2010.
- [143] Luiz R. O. Tosi and Stephen M. Beverley. cis and trans factors affecting mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res*, 28 :784–790, 2000.
- [144] C Augé-Gouillou, M H Hamelin, M V Demattei, G Periquet, and Y Bigot. The itr binding domain of the mariner mos-1 transposase. *Mol Genet Genomics*, 265 :58–65, 2001.
- [145] J C Vos and R H Plasterk. Tc1 transposase of caenorhabditis elegans is an endonuclease with a bipartite dna binding domain. *EMBO J*, 13 :6125–6132, 1994.
- [146] J C Vos, I De Baere, and R H Plasterk. Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of tc1. *Genes Dev*, 10 :755–761, 1996.
- [147] Zsuzsanna Izsvák, Eva E Stüwe, Dora Fiedler, Andrea Katzer, Penny A Jeggo, and Zoltán Ivics. Healing the wounds inflicted by sleeping beauty transposition by double-strand break repair in mammalian somatic cells. *Mol Cell*, 13 :279–290, 2004.
- [148] Neil D Huefner, Yurie Mizuno, Clifford F Weil, Ian Korf, and Anne B Britt. Breadth by depth : expanding our understanding of the repair of transposon-induced dna double strand breaks via deep-sequencing. *DNA Repair (Amst)*, 10 :1023–1033, 2011.
- [149] H G van Luenen and R H Plasterk. Target site choice of the related transposable elements tc1 and tc3 of caenorhabditis elegans. *Nucleic Acids Res*, 22 :262–269, 1994.

- [150] R F Ketting, S E Fischer, and R H Plasterk. Target choice determinants of the *tc1* transposon of *caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, 25 :4041–4047, 1997.
- [151] Thomas J Vigdal, Christopher D Kaufman, Zsuzsanna Izsvák, Daniel F Voytas, and Zoltán Ivics. Common physical properties of dna affecting target site selection of sleeping beauty and other *tc1*/mariner transposable elements. *J Mol Biol*, 323 :441–452, 2002.
- [152] Guillaume Carpentier, Jérôme Jaillet, Aude Pflieger, Jérémy Adet, Sylvaine Renault, and Corinne Augé-Gouillou. Transposase-transposase interactions in *mos1* complexes : a biochemical approach. *J Mol Biol*, 405 :892–908, 2011.
- [153] Julia M Richardson, Sean D Colloms, David J Finnegan, and Malcolm D Walkinshaw. Molecular architecture of the *mos1* paired-end complex : the structural basis of dna transposition in a eukaryote. *Cell*, 138 :1096–1108, 2009.
- [154] Ming-Hsun Ho, Marco De Vivo, Matteo Dal Peraro, and Michael L Klein. Understanding the effect of magnesium ion concentration on the catalytic activity of ribonuclease h through computation : does a third metal binding site modulate endonuclease catalysis? *J Am Chem Soc*, 132 :13702–13712, 2010.